

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790799 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.08.31

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.10.08

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА И ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

(31) 62/061,644; 62/198,673; 62/220,764

(32) 2014.10.08; 2015.07.29; 2015.09.18

(33) US

(86) PCT/US2015/054775

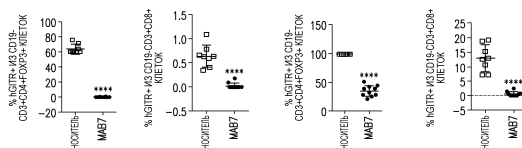
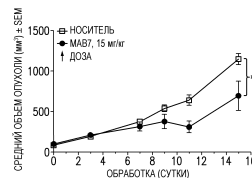
(87) WO 2016/057846 2016.04.14

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Брогдон Дженнифер, Чиполлетта
Даниэла, Дранофф Гленн, Ни Дебора
А., Ван Фэй (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к композициям антител, включающим, например, антитела, сконструированные антитела и фрагменты антител, которые связывают член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (т.е., 18). Представленные композиции можно использовать для усиления ответа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и для лечения, облегчения и предотвращения заболеваний, которым можно противостоять с помощью усиленного иммунного ответа, например, злокачественных опухолей. Изобретение относится также к полинуклеотидам и векторам, кодирующим такие молекулы, и к клеткам-хозяевам, несущим полинуклеотиды или векторы; так же как к фармацевтическим композициям, содержащим такие молекулы, и к способам их применения.



A1

201790799

201790799

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-541764ЕА/045

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА И ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет и преимущества Предварительной заявки США No. 62/061644, поданной 8 октября 2014 г., Предварительной заявки США No. 62/198673, поданной 29 июля 2015 г., и Предварительной заявки США No. 62/220764, поданной 18 сентября 2015 г., полное содержание каждой из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к антителам, фрагментам антител и антигенсвязывающим молекулам, которые связывают член 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей/индуцируемый глюкокортикоидами родственный TNFR белок («GITR»), и более конкретно, которые являются агонистами, стимулируют передачу сигнала через рецептор и/или модулируют иммунный ответ.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДЛЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Индуцируемый глюкокортикоидами родственный TNFR белок («GITR») является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF), которое включает в себя более 20 трансмембранных белков типа I, несколько вариантов сплайсинга и несколько вирусных белков, все из которых обладают богатым цистеином доменом в качестве общего структурного признака. Внеклеточный домен (ECD) GITR состоит из 3 богатых цистеином доменов (CRD), за ним следует трансмембранный домен (TM) и внутриклеточный домен (ICD).

[0004] В CD4+CD25+ регуляторных Т-клетках мыши и человека детектирована конститутивная экспрессия GITR, которая может быть дополнительно увеличена после активации. В отличие от этого, эффекторные CD4+CD25- Т-клетки и CD8+CD25- Т-клетки экспрессируют от низких до не поддающихся детекции уровней GITR, которые подвергаются быстрой повышающей регуляции после активации Т-клеточного рецептора. Экспрессия GITR детектирована также на

активированных клетках NK, дендритных клетках и макрофагах. Показано, что путь передачи сигнала ниже GITR включает в себя пути MAPK и канонические пути NFκB. Различные члены семейства TRAF вовлечены в качестве промежуточных элементов передачи сигнала ниже GITR (Nocentini et al. (2005) Eur. J. Immunol., 35:1016-1022).

[0005] Считают, что активация клеток посредством GITR выполняет несколько функций в зависимости от типа и микроокружения клеток, включая, но без ограничения, костимуляцию для усиления пролиферации и эффекторных функций, ингибирование супрессии регуляторными Т-клетками, и защиту от индуцированной активацией клеточной смерти (Shevach and Stephens (2006) Nat. Rev. Immunol., 6:613-618). Ko et al. ((2005) J. Exp. Med., 202:885-891) впервые показали, что агонистическое моноклональное антитело против GITR мыши эффективно индуцировало специфический для опухолей иммунный ответ и уничтожало развившиеся опухоли в модели сингенных опухолей на мышах. Дополнительно и/или альтернативно, показано, что антитело против mGITR, обладающее функциональной эффекторной активностью Fc, в некоторых доклинических моделях истощает регуляторные Т-клетки, так же как усиливает пролиферацию и секрецию цитокинов в эффекторных Т-клетках в избранном окружении опухолей. Эти обнаружения позволяют предполагать, что агонистическое антитело против mGITR может нарушать равновесие иммунной толерантности, что в свою очередь позволяет Т-клеткам бороться с опухолями и персистирующими вирусными инфекциями. Однако, исследования до настоящего времени были сфокусированы главным образом на применении суррогатных антител в системах грызунов. Из-за расхождения структуры между GITR мыши и человека, неизвестно, можно ли переносить наблюдения, полученные в суррогатных исследованиях на мышах, на модификацию функции GITR человека.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Авторы настоящего изобретения идентифицировали антитела, специфически связывающиеся с индуцируемым глюкокортикоидами членом суперсемейства рецепторов фактора

некроза опухолей 18 человека («G1TR»), где антитела обладают активностью агониста hG1TR *in vitro* при перекрестном сшивании *in vitro*, и где антитела обеспечивают активность hG1TR *in vivo* и индуцируют повышение соотношения Тэфф:Трег в участках опухолей, что приводит к ингибированию прогрессирования опухолей. Таким образом, настоящее изобретение относится к агонистическим антителам, фрагментам антител и антигенсвязывающим молекулам, которые осуществляют специфическое связывание и стимулируют внутриклеточную передачу сигналов и/или модулируют иммунный ответ посредством нацеливания на клетки, экспрессирующие G1TR человека. В одном аспекте изобретение относится к выделенным антителам, фрагментам антител и антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связывают G1TR человека, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается с эпитопом, содержащим богатый цистеином домен 1 («CRD1», SEQ ID NO:4: CGPGRLLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDC) и богатый цистеином домен 2 («CRD2», SEQ ID NO:5: MCVQPEFHCGDPCSTTCRHHPCPPGQGVQSQGFSGFQC), и где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула является агонистом G1TR, и где антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула, необязательно, обладает интактной или усиленной эффекторной функцией по отношению к FcR.

[0007] В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула связывается с эпитопом, содержащим SEQ ID NO:88, из G1TR человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула конкурирует с антителом или фрагментом антитела, которые связываются с эпитопом, содержащим SEQ ID NO:88, из G1TR человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком внутри SEQ ID NO:88 из G1TR человека, например, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается с эпитопом, который перекрывается с SEQ ID NO:88 из G1TR человека.

[0008] В некоторых вариантах осуществления, антитело,

фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается с эпитопом, содержащим CRD1 (остатки 34-72, SEQ ID NO:4) и остаток 78 из GITR человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула конкурирует с антителом или фрагментом антитела, которые связываются с эпитопом внутри CRD1 (остатки 34-72, SEQ ID NO:4) и остатком 78 из GITR человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком внутри CRD1 (остатки 34-72, SEQ ID NO:4) и остатком 78 из GITR человека, например, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается с эпитопом, который перекрывается с CRD1 (остатки 34-72, SEQ ID NO:4) и остатком 78 из GITR человека.

[0009] В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается с SEQ ID NO:1 и содержит (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую человеческую тяжелую цепь, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, и ii) CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27, и iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:109; и (b) а переменную область легкой цепи, где i) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30 или SEQ ID NO:31, и ii) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и iii) the CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0010] В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается с SEQ ID NO:88 и содержит (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую человеческую тяжелую цепь, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, и ii) CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27, и iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:109; и (b) переменную область легкой цепи, где i) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30 или SEQ ID NO:31, и ii) CDR2 легкой цепи

содержит SEQ ID NO:33, и iii) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0011] По отношению к дополнительным вариантам осуществления антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих молекул, в некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи обладает по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из SEQ ID NO:16, и переменная область легкой цепи обладает по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из SEQ ID NO:17. В конкретных вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:16 и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:17. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула конкурирует с антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:16, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:17.

[0012] В некоторых вариантах осуществления, FR4 тяжелой цепи представляет собой человеческую зародышевую FR4. В конкретных вариантах осуществления, FR4 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO:42.

[0013] В некоторых вариантах осуществления, FR4 легкой цепи представляет собой человеческую зародышевую FR4. В конкретных вариантах осуществления, FR4 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO:50.

[0014] В некоторых вариантах осуществления представлено антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:84; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:80; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:109; iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30 или SEQ ID NO:85; v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33 или SEQ ID NO:82, и vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34 или SEQ ID NO:83.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, представлено

антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:23; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29; iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30; v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33 и vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0016] В некоторых вариантах осуществления представлено антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:24; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29; iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:31; v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, представлено антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29; iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30; v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и vi) the CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, представлено антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:26; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29; iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30; v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, представлено антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:27; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29; iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30; v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0020] В некоторых вариантах осуществления, представлено антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула,

где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:109; iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30; v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

[0021] В следующем аспекте, изобретение относится к антителам, фрагментам антител или антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связываются с GITR, где антитело или фрагмент антитела содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где: i) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:22, SEQ ID NO: 79 или SEQ ID NO:84; ii) CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:62 и SEQ ID NO:80; iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:109; iv) CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:85, и SEQ ID NO:86; v) CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:64, и SEQ ID NO:82; и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34 или SEQ ID NO:83.

[0022] В других вариантах осуществления антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих молекул, переменная область тяжелой цепи обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:99 и SEQ ID NO:105, и переменная область легкой цепи обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:7. В конкретных вариантах осуществления, выделенное антитело, фрагмент антитела или

антигенсвязывающая молекула содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:99 и SEQ ID NO:105; и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула содержит переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO:6 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело или фрагмент антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:8, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9. В других вариантах осуществления, выделенное антитело или фрагмент антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:10, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:7. В других вариантах осуществления, выделенное антитело или фрагмент антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:12, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:7. В других вариантах осуществления, выделенное антитело или фрагмент антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:14, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:7.

[0023] По отношению к дополнительным вариантам осуществления антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих молекул, в некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из SEQ ID NO:99, и переменная область легкой цепи обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело или фрагмент антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:99 и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:7.

[0024] По отношению к дополнительным вариантам

осуществления антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих молекул, в некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из SEQ ID NO:105, и переменная область легкой цепи обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью из SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело или фрагмент антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:105, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:7.

[0025] В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, которые связываются с GITR, являются гуманизированными. В конкретных вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела содержит человеческую константную область.

[0026] В некоторых вариантах осуществления, фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (scFv). В некоторых вариантах осуществления, фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело или наноантитело.

[0027] В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела является перекрестно сшитым с вторым антителом или фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело является гликозилированным.

[0028] В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула представляет собой IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула содержит область Fc антитела изотипа IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит область Fc антитела изотипа IgG1 или IgG2. В конкретных вариантах осуществления антитело, фрагмент антитела,

или антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело IgG1 или IgG2. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одну мутацию, модулирующую (т.е., увеличивающую или уменьшающую) связывание антитела или фрагмента антитела с рецептором Fc. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одну мутацию, модулирующую (т.е., увеличивающую или уменьшающую) способность антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы активировать рецептор Fc. В конкретных вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одну мутацию, увеличивающую связывание антитела или фрагмента антитела с рецептором Fc. В конкретных вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одну мутацию, увеличивающую способность антитела, фрагмента антитела, или антигенсвязывающей молекулы активировать рецептор Fc.

[0029] В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула обладает перекрестной реактивностью по отношению к GITR человека и не относящегося к человеку примата. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула не обладает перекрестной реактивностью по отношению к GITR грызунов, например, GITR крысы или GITR мыши.

[0030] В родственном аспекте, изобретение, кроме того, относится к полинуклеотидам, кодирующим антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу по изобретению, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи, обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:102. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий переменную

область тяжелой цепи, обладает по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:101 и SEQ ID NO:107. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи, обладает последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:102. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи, обладает последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:101 и SEQ ID NO:107.

[0031] В родственном аспекте, изобретение, кроме того, относится к композициям, содержащим антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу по изобретению, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу по изобретению для введения индивидууму.

[0032] В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит антиген-мишень, например, ассоциированный со злокачественной опухолью антиген или опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой вирусный антиген, бактериальный антиген, грибковый антиген или паразитический антиген.

[0033] В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит антагонист CTLA4. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит антагонист LAG3. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит антагонист TIM3. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит ингибитор взаимодействия PD-1/PD-L1 (например, B7-H1 или его аналог, антитело против PD-1). В конкретных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит антагонист PD-1. В конкретных

вариантах осуществления композиция дополнительно содержит антагонист PD-L1.

[0034] В следующем аспекте, изобретение, кроме того, относится к наборам, содержащим антитело или фрагмент антитела по изобретению, как описано в настоящем документе.

[0035] В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат второе средство для совместного введения с антителом. В некоторых вариантах осуществления, второе средство представляет собой антиген-мишень, например, ассоциированный со злокачественной опухолью антиген или опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой вирусный антиген, бактериальный антиген, грибковый антиген или паразитический антиген.

[0036] В некоторых вариантах осуществления, второе средство представляет собой антагонист CTLA4. В некоторых вариантах осуществления, второе средство представляет собой антагонист TIM3. В некоторых вариантах осуществления, второе средство представляет собой антагонист LAG3. В некоторых вариантах осуществления, второе средство представляет собой ингибитор взаимодействия PD-1/PD-L1 (например, B7-H1 или его аналог, антитело против PD-1). В конкретных вариантах осуществления второе средство представляет собой антагонист PD-1. В конкретных вариантах осуществления второе средство представляет собой антагонист PD-L1.

[0037] Необязательно, антитело или фрагмент антитела и второе средство представлены в форме смеси. Необязательно, антитело или фрагмент антитела и второе средство представлены в отдельных составах.

[0038] В другом аспекте изобретение относится к способам усиления ответа Т-клеток у нуждающегося в этом индивидуума, включающим в себя введение индивидууму терапевтически эффективного количества агонистического антитела или фрагмента антитела против GITR по изобретению, как описано в настоящем документе. В следующем аспекте, изобретение относится к агонистическому антителу или фрагменту антитела против GITR по

изобретению для применения для усиления ответа Т-клеток у индивидуума. В следующем аспекте, изобретение относится к композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела по изобретению для применения для усиления ответа Т-клеток у индивидуума.

[0039] В следующем аспекте, изобретение относится к способам лечения роста злокачественной опухоли, экспрессирующей опухолеассоциированный антиген, у нуждающегося в этом индивидуума, включающим в себя введение индивидууму терапевтически эффективного количества агонистического антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы против GITR по изобретению, как описано в настоящем документе. Изобретение, кроме того, относится к агонистическому антителу или фрагменту антитела против GITR по изобретению для применения для лечения роста злокачественной опухоли у индивидуума. Изобретение, кроме того, относится к композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела по изобретению для применения для уменьшения, ингибирования или предотвращения роста злокачественной опухоли, экспрессирующей опухолеассоциированный антиген, у индивидуума.

[0040] По отношению к вариантам осуществления способов и применений в медицине, в некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой ассоциированный со злокачественной опухолью антиген или а опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело или фрагмент антитела против GITR вводят совместно с клетками злокачественных опухолей от пациента, т.е., аутологичными клетками злокачественных опухолей.

[0041] В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с антагонистом CTLA4. В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с антагонистом LAG3. В некоторых вариантах

осуществления, агонистическое антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с антагонистом TIM3. В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело или фрагмент антитела против GITR вводят совместно с ингибитором взаимодействия PD-1/PD-L1 (например, B7-H1). В конкретных вариантах осуществления, агонистическое антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с антагонистом PD-1. В конкретных вариантах осуществления, агонистическое антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с антагонистом PD-L1.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с химиотерапевтическим средством или цитотоксином.

[0043] В некоторых вариантах осуществления, ответ Т-клеток представляет собой ответ Т-клеток CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). В некоторых вариантах осуществления, ответ Т-клеток представляет собой ответ CD4+ Т-клеток-помощников (Th).

[0044] В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет злокачественную опухоль, экспрессирующую опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, колоректального рака, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и рака молочной железы. В одном варианте осуществления, тип злокачественной опухоли выбран из группы, состоящей из: рака поджелудочной железы, меланом, рака молочной железы, рака легкого, рака бронхов, колоректального рака, рака предстательной железы, рака желудка, рака яичника, рака мочевого пузыря, злокачественной опухоли головного мозга или центральной нервной системы, злокачественной опухоли периферической нервной системы, рака пищевода, рака шейки матки, злокачественной опухоли тела или эндометрия матки, злокачественной опухоли полости рта или глотки, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), рака печени, рака почки, рака яичка, рака желчных протоков, злокачественной опухоли тонкого

кишечника или аппендикса, злокачественной опухоли слюнных желез, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли надпочечника, остеосаркомы, хондросаркомы и злокачественной опухоли кроветворных тканей.

[0045] В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет инфекционное заболевание, например, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковый антиген или паразитический антиген. В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело против GITR вводят совместно с вирусным антигеном (например, из HCV, HSV или HIV). В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело против GITR вводят совместно с бактериальным антигеном. В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело против GITR вводят совместно с грибковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления, агонистическое антитело против GITR вводят совместно с паразитическим антигеном (например, при филяриозе).

[0046] В других вариантах осуществления, представлено выделенное антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула для применения в терапии. В конкретных вариантах осуществления представлены антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула для применения для усиления ответа Т-клеток у нуждающегося в этом индивидуума. В конкретных вариантах осуществления представлены антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула для применения в лечении роста опухоли у нуждающегося в этом индивидуума.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0047] «Антитело» относится к полипептиду из семейства иммуноглобулинов, способному нековалентно, обратимо и специфически связывать соответствующий антиген. Иллюстративная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара обладает одной «легкой» цепью (приблизительно 25 кДа) и одной «тяжелой» цепью (приблизительно 50-70 кДа), соединенными посредством дисульфидной связи. Известные гены иммуноглобулинов включают в себя гены константной области κ , λ , α , γ , δ , ϵ и μ ,

так же как огромное количество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируют как κ или λ . Тяжелые цепи классифицируют как γ , μ , α , δ или ϵ , которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Антитела по изобретению могут принадлежать к любому изотипу/классу (например, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE) или любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2). N-конец каждой цепи определяет переменную область из приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственных за узнавание антигена. Термины переменная область легкой цепи (V_L) и переменная область тяжелой цепи (V_H) относятся к этим областям легкой и тяжелой цепей, соответственно. В дополнение к V-областям, как тяжелые цепи, так и легкие цепи содержат константную (C) область или домен. Секретируемая область иммуноглобулина C состоит из трех доменов C, CH1, CH2, CH3, необязательно, CH4 (C μ), и шарнирной области. Связанная с мембраной форма области C иммуноглобулина имеет также мембранный и внутриклеточный домены. Каждая легкая цепь имеет V_L на N-конце, затем константный домен (C) на другом конце. V_L соединена с V_H , и C_L соединена с первым константным доменом тяжелой цепи. Спаривание V_H и V_L вместе формирует один антигенсвязывающий участок. Иммуноглобулин IgG «общепринятого антитела», как применяют в настоящем документе, относится к антителу в конфигурации, которая встречается в природе. Как правило, общепринятое антитело IgG имеет четыре цепи, две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи, соединенные вместе посредством дисульфидных связей. Как применяют в настоящем документе, «антитело» включают в себя также варианты антител и общепринятые структуры антител, которые обладают конкретной специфичностью связывания, т.е., для GITR. Таким образом, в объем этой концепции входят полноразмерные антитела, химерные антитела и гуманизированные антитела, которые обладают конкретной специфичностью связывания для GITR.

[0048] Антитела существуют в форме интактных иммуноглобулинов или в форме ряда хорошо охарактеризованных

фрагментов, полученных посредством расщепления различными пептидазами. Таким образом, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с получением $F(ab')_2$, димера Fab' , который сам представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H - C_H1 посредством дисульфидных связей. $F(ab')_2$ можно восстанавливать в мягких условиях для разрушения дисульфидной связи в шарнирной области, таким образом, превращая димер $F(ab')_2$ в мономер Fab' . Мономер Fab' представляет собой в основном Fab с частью шарнирной области. Paul, *Fundamental Immunology* 3d ed. (1993). В то время как различные фрагменты антител определены в отношении расщепления интактного антитела, специалисту в данной области понятно, что такие фрагменты можно синтезировать *de novo* либо химически, либо с использованием способа рекомбинантной ДНК. Как применяют в настоящем документе, «фрагмент антитела» относится к одной или нескольким частям антитела, либо полученным посредством модификации полноразмерных антител, либо синтезированным *de novo* с использованием способов рекомбинантной ДНК, которые сохраняют специфичность связывания и агонистическую активность в отношении GITR. Примеры фрагментов антител включают в себя фрагменты F_v , одноцепочечные антитела ($ScFv$), Fab , Fab' , Fd (домены V_h и C_H1), dAb (V_h и выделенная CDR); и мультимерные варианты этих фрагментов (например, $F(ab')_2$) с той же самой специфичностью связывания. Фрагменты антител можно включать также в однодоменные антитела, максиантитела, миниантитела, диатела, триатела, тетратела, $vNAR$, бис- $scFv$, и другие варианты антителоподобных соединений для обеспечения специфичности связывания и активности, представленных по настоящему изобретению.

[0049] Домен « Fab », как применяют в контексте изобретения, содержит переменный домен тяжелой цепи, константную область домена C_H1 , переменный домен легкой цепи и домен C_L константной области легкой цепи. Взаимодействие доменов стабилизируют посредством дисульфидной связи между доменами C_H1 и C_L . В некоторых вариантах осуществления, домены тяжелой цепи Fab представляют собой, в порядке от N-конца до C-конца, VH - CH ,

и домены легкой цепи Fab представляют собой, в порядке от N-конца до С-конца, VL-CL. В некоторых вариантах осуществления, домены тяжелой цепи Fab представляют собой, в порядке от N-конца до С-конца, CH-VH, и домены легкой цепи Fab расположены в порядке CL-VL. Несмотря на то, что Fab исторически идентифицированы посредством расщепления папаином интактного иммуноглобулина, в контексте этого изобретения, «Fab», как правило, получают любым рекомбинантным способом. Каждый фрагмент Fab является одновалентным по отношению к связыванию антигена, т.е., он обладает одним антигенсвязывающим участком.

[0050] С-концевая часть тяжелых цепей иммуноглобулинов, содержащая домены CH2 и CH3, представляет собой домен «Fc». «Область Fc», как применяют в настоящем документе, относится к константной области антитела, исключая первый домен константной области иммуноглобулина. Fc относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина из IgA, IgD и IgG, и к трем последним доменам константной области иммуноглобулина из IgE и IgM, и к гибкому шарниру ближе к N-концу от этих доменов. Для IgA и IgM Fc может включать в себя цепь J. Для IgG, Fc содержит домены иммуноглобулина C γ 2 и C γ 3, и шарнирную область между C γ 1 и C γ . Специалисту в данной области понятно, что границы области Fc могут меняться, однако, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как содержащую остатки C226 или P230 на ее карбокси-конце, с использованием нумерации в соответствии с индексом EU как в Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). «Область Fc» может относиться к этой выделенной области или к этой области в контексте антитела или фрагмента антитела. «Область Fc» включает в себя встречающиеся в природе аллельные варианты области Fc, например, в области CH2 и CH3, так же как модификации, модулирующие эффекторную функцию. Области Fc включают в себя также варианты, не приводящие к изменениям в биологической функции. Например, одну или несколько аминокислот можно делетировать с N-конца или С-конца области Fc иммуноглобулина без существенной потери биологической функции.

Например, в конкретных вариантах осуществления С-концевой лизин можно модифицировать, заменять или удалять. В конкретных вариантах осуществления один или несколько С-концевых остатков в области Fc изменены или удалены. В конкретных вариантах осуществления один или несколько С-концевых остатков в Fc (например, концевой лизин) делетирован. В других конкретных вариантах осуществления один или несколько С-концевых остатков в Fc заменены на альтернативную аминокислоту (например, концевой лизин заменен). Такие варианты можно выбирать в соответствии с общими правилами, известными в данной области, так чтобы оказывать минимальный эффект на активность (см., например, Bowie, et al., Science 247:306-1310, 1990). Домен Fc представляет собой часть Ig, которую узнают рецепторы клеток, такие как FcR, и с которой связывается активирующий комплемент белок, C1 q. Нижняя шарнирная область, кодируемая 5'-частью экзона CH2, обеспечивает гибкость антитела для связывания с рецепторами FcR.

[0051] «Определяющие комплементарность домены» или «определяющие комплементарность области («CDR») взаимозаменяемо относятся к гипервариабельным областям V_L и V_H. CDR представляют собой участок связывания белка-мишени на цепях антитела, несущий специфичность для такого белка-мишени. Существуют три CDR (CDR1-3, пронумерованные последовательно с N-конца) в каждой V_L или V_H человека, составляющих приблизительно 15-20% из вариабельных доменов. CDR являются структурно комплементарными эпитопу на белке-мишени, и таким образом, непосредственно отвечают за специфичность связывания. Для оставшихся участков V_L или V_H, так называемых каркасных областей, показана меньшая изменчивость в аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0052] Положения CDR и каркасных областей можно определять с использованием различных хорошо известных в данной области определений, например, Kabat, Chothia, международная база данных ImMunoGeneTics (IMGT) (web-сайт imgt.cines.fr/), и AbM (см., например, Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia и Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et

al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani *et al.*, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Определения антигенсвязывающих участков описаны также в следующих ссылках: Ruiz *et al.*, Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); и Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); и Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin *et al.*, Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); и Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

[0053] По Kabat, аминокислотные остатки CDR в V_H пронумерованы 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в V_L пронумерованы 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). По Chothia, CDR аминокислоты в V_H пронумерованы 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в V_L пронумерованы 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). При комбинации определений CDR как по Kabat, так и по Chothia, CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в V_H человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в V_L человека.

[0054] Термин «детерминанта специфичности связывания» или «BSD» взаимозаменяемо относятся к минимальной смежной или несмежной аминокислотной последовательности внутри определяющей комплементарность области, необходимой для определения специфичности связывания антитела. Минимальная детерминанта специфичности связывания может находиться внутри одной или нескольких последовательностей CDR. В некоторых вариантах осуществления, минимальные детерминанты специфичности связывания находятся внутри части последовательностей или внутри полноразмерных последовательностей CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела (т.е., определяются единственно ими).

[0055] «Легкая цепь антитела» или «тяжелая цепь антитела», как применяют в настоящем документе, относится к полипептиду, содержащему V_L или V_H , соответственно. Эндогенную V_L кодируют сегменты генов V (вариабельный) и J (соединительный), и

эндогенную $V_H - V, D$ (обеспечивающий разнообразие), и J. Каждая из V_L или V_H включает CDR, так же как каркасные области. В этой заявке, легкие цепи антитела и/или тяжелые цепи антитела можно, время от времени, вместе обозначать как «цепи антитела». Эти термины включают в себя цепи антитела, содержащие мутации, которые не нарушают основную структуру V_L или V_H , как понятно специалисту в данной области.

[0056] Термин «валентность», как применяют в настоящем документе, относится к количеству потенциальных участков связывания мишени в полипептиде. Каждый участок связывания мишени специфически связывает одну молекулу-мишень или специфический участок на молекуле-мишени. Когда полипептид содержит более одного участка связывания мишени, каждый участок связывания мишени может специфически связывать одинаковые или различные молекулы (например, может связывать различные молекулы, например, различные антигены, или различные эпитопы на одной и той же молекуле). Общепринятое антитело, например, имеет два связывающих участка и является двухвалентным. Антитела, антигенсвязывающие молекулы и их фрагменты могут являться одновалентными (т.е., связывать одну молекулу-мишень), двухвалентными или мультивалентными (т.е., связывать более одной молекулы-мишени).

[0057] Для получения моноклональных или поликлональных антител, можно использовать любой способ, известный в данной области (см., например, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985). Способы получения одноцепочечных антител (Патент США No. 4946778) можно адаптировать для получения антител против полипептидов по этому изобретению. А также, трансгенных мышей или другие организмы, такие как другие млекопитающие, можно использовать для экспрессии приматизитрованных или гуманизированных антитела. Альтернативно, способ фагового дисплея можно использовать для идентификации антител и гетеромерных фрагментов Fab, которые специфически связываются с избранными антигенами (см., например, McCafferty

et al., *выше*; Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10:779-783, (1992)).

[0058] Способы приматизации или гуманизации не относящихся к человеческим антител хорошо известны в данной области. Как правило, приматизированное или гуманизированное антитело обладает одним или несколькими аминокислотными остатками, введенными в него из источника, не относящегося к приматам или не относящегося к человеку. Эти не относящиеся к приматам или не относящиеся к человеку аминокислотные остатки часто обозначают как импортированные остатки, которые как правило, взяты из импортированного вариабельного домена. Гуманизацию в основном можно проводить способом Winter и соавторов (см., например, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)), посредством замены на CDR или последовательности CDR грызунов соответствующих последовательностей человеческого антитела. Соответственно, такие гуманизированные антитела представляют собой химерные антитела (Патент США No. 4816567), где значительно меньше, чем интактный человеческий вариабельный домен, заменяют на соответствующую последовательность из не относящихся к человеку видов. На практике, приматизированные или гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела приматов или человека, в которых некоторые остатки определяющей комплементарности области («CDR») и, возможно, некоторые остатки каркасной области («FR») заменены на остатки из аналогичных участков исходных видов (например, антител грызунов) для придания специфичности связывания.

[0059] «Химерное антитело» представляет собой молекулу антитела, в которой (а) константную область, или ее часть, изменяют, заменяют или подвергают обмену, так что антигенсвязывающий участок (вариабельная область) является связанным с константной областью отличного или измененного класса, эффекторной функции и/или вида, или с полностью отличной молекулой, придающей новые свойства химерному антителу, например, ферментом, токсином, гормоном, фактором роста и лекарственным средством; или (b) вариабельную область, или ее

часть, изменяют, заменяют или подвергают обмену на переменную область, обладающую отличной или измененной антигенной специфичностью.

[0060] Антитела или антигенсвязывающие молекулы по изобретению, кроме того, включают в себя одну или несколько цепей иммуноглобулинов, химически конъюгированные с другими белками, или экспрессированные в форме слитых белков с другими белками. Они включают в себя также биспецифическое антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, обладающее двумя различными парами тяжелая/легкая цепь и двумя различными участками связывания. Другие антигенсвязывающие фрагменты или части антитела по изобретению включают в себя двухвалентный scFv (диатело), биспецифические антитела scFv, где молекула антитела узнает два различных эпитопа, одиночные связывающие домены (dAb) и миниантитела.

[0061] Различные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно получать посредством ферментативной или химической модификации интактных антител, или синтезировать *de novo* с использованием способов рекомбинантной ДНК (например, одноцепочечный Fv), или идентифицировать с использованием библиотек фагового дисплея (см., например, McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990). Например, миниантитела можно получать с использованием способов, описанных в данной области, например, Vaughan and Sollazzo, Comb Chem High Throughput Screen. 4:417-30 2001. Биспецифические антитела можно получать множеством способов, включая слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992). Одноцепочечные антитела можно идентифицировать с использованием библиотек фагового дисплея или библиотек рибосомного дисплея, библиотек с перетасовкой генов. Такие библиотеки можно конструировать из синтетических, полусинтетических или нативных и иммунокомпетентных источников.

[0062] Термин «антигенсвязывающая молекула» или «не

относящийся к антителу лиганд» относится к миметикам антител, в которых использованы каркасы не относящихся к иммуноглобулинам белков, включая, но без ограничения, аднектины, авимеры, одноцепочечные полипептидные связывающие молекулы, и антителоподобные связывающие пептидомиметики.

[0063] Термин «вариабельная область» или «V-область» взаимозаменяемо относятся к области тяжелой или легкой цепи, содержащей FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Эндогенная вариабельная область кодирована генами V-D-J тяжелой цепи или генами V-J легкой цепи иммуноглобулина. V-область может являться природной, рекомбинантной или синтетической.

[0064] Как применяют в настоящем документе, термин «вариабельный сегмент» или «V-сегмент» взаимозаменяемо относятся к подпоследовательности вариабельной области, включающей в себя FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3. Эндогенный V-сегмент кодирован V-геном иммуноглобулина. V-сегмент может являться природным, рекомбинантным или синтетическим.

[0065] Как применяют в настоящем документе, термин «J-сегмент» относится к подпоследовательности кодируемой вариабельной области, содержащей C-концевую часть CDR3 и FR4. Эндогенный J-сегмент кодирован J-геном иммуноглобулина. J-сегмент может являться природным, рекомбинантным или синтетическим.

[0066] «Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, которое сохраняет реактивность (например, специфичность связывания, активность) не относящегося к человеку антитела, в то же время являясь менее иммуногенным для человека. Этого можно достигать, например, посредством сохранения не относящихся к человеку областей CDR и замены оставшихся частей антитела на человеческие эквиваленты. См., например, Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison и Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

[0067] Термин «соответствующая человеческая зародышевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой

кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность вариабельной области, разделяющую наивысшую определенную идентичность аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью вариабельной области по сравнению со всеми другими известными аминокислотными последовательностями вариабельной области, кодируемыми человеческими зародышевыми последовательностями вариабельных областей иммуноглобулинов. Соответствующая человеческая зародышевая последовательность может также относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности человеческой вариабельной области с наивысшей идентичностью аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью вариабельной области по сравнению со всеми другими оцененными аминокислотными последовательностями вариабельной области. Соответствующая человеческая зародышевая последовательность может представлять собой только каркасные области, только определяющие комплементарность области, каркасные и определяющие комплементарность области, вариабельный сегмент (как определено выше), или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, содержащих вариабельную область. Идентичность последовательности можно определять с использованием способов, описанных в настоящем документе, например, выравнивания двух последовательностей с использованием BLAST, ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного в данной области. Соответствующая человеческая зародышевая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность может обладать по меньшей мере приблизительно 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью вариабельной области. Соответствующие человеческие зародышевые последовательности можно определять, например, посредством публично доступных международной базы данных ImMunoGeneTics (IMGT) (web-сайт imgt.cines.fr/) и V-base (web-сайт vbase.mrc-

сре.cam.ac.uk) .

[0068] Фраза «специфически связывает» или «избирательно связывает», при использовании в контексте описания взаимодействия между антигеном (например, белком) и антителом, фрагментом антитела или происходящим из антитела связывающим средством, относится к реакции связывания, определяющей присутствие антигена в гетерогенной популяции белков и других биологических веществ, например, в биологическом образце, например, образце крови, сыворотки, плазмы или ткани. Таким образом, в конкретных указанных условиях иммуноанализа, антитела или связывающие средства с конкретной специфичностью связывания связываются с конкретным антигеном по меньшей мере в два раза сильнее по сравнению с фоном и по существу не связываются в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце. В одном варианте осуществления, в обозначенных условиях иммуноанализа, антитело или связывающие средства с конкретной специфичностью связывания связываются с конкретным антигеном по меньшей мере в десять (10) раз сильнее по сравнению с фоном и по существу не связываются в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце. Специфическое связывание антитела или связывающего средства в таких условиях может требовать отбора антитела или средства по их специфичности для конкретного белка (например, GITR человека). Как применяют в настоящем документе, специфическое связывание включает в себя антитела, их фрагменты и связывающие молекулы, которые избирательно связываются с GITR человека, и не включает в себя антитела, обладающие перекрестной реактивностью по отношению, например, к молекулам GITR мыши или другим членам суперсемейства рецептора TNF. В некоторых вариантах осуществления, отбирают антитела или фрагменты антител, обладающие перекрестной реактивностью по отношению к GITR не относящихся к человеку приматов (например, GITR яванского макака).

[0069] Множество форматов иммуноанализа можно использовать для отбора антител, обладающих специфической иммунореактивностью по отношению к конкретному белку. Например, твердофазные иммуноанализы ELISA общепринятым образом используют

для отбора антител, обладающих специфической иммунореактивностью по отношению к белку (см., например, в Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), описание форматов и условий иммуноанализа, которые можно использовать для определения специфической иммунореактивности). Как правило, при специфической специфической или избирательной реакции связывания получают сигнал, по меньшей мере в два раза превышающий фоновый сигнал, и более конкретно, по меньшей мере в 10-100 раз превышающий фон.

[0070] Термин «равновесная константа диссоциации (K_D , M)» относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости связывания (k_a , время⁻¹, M⁻¹). Равновесные константы диссоциации можно измерять с использованием любого известного в данной области способа. Антитела по настоящему изобретению, как правило, обладают равновесной константой диссоциации менее приблизительно 10⁻⁷ или 10⁻⁸ M, например, менее приблизительно 10⁻⁹ M или 10⁻¹⁰ M, в некоторых вариантах осуществления, менее приблизительно 10⁻¹¹ M, 10⁻¹² M или 10⁻¹³ M. В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело или фрагмент антитела связывается с GITR человека с равновесной константой диссоциации (K_D) приблизительно 1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела связывается с GITR человека с K_D менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела связывается с GITR человека с K_D , лежащей в диапазоне от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 1,0 нМ.

[0071] Как применяют в настоящем документе, термин «антигенсвязывающая область» относится к домену связывающей GITR молекулы по этому изобретению, ответственному за специфическое связывание между молекулой и GITR. Антигенсвязывающая область включает в себя по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи антитела и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи антитела. Существует по меньшей мере одна такая антигенсвязывающая область, присутствующая в каждой связывающей GITR молекуле по этому изобретению, и каждая из антигенсвязывающих областей может являться идентичной или

отличной от других. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из антигенсвязывающих областей связывающей GITR молекулы по этому изобретению действует как агонист GITR.

[0072] Термин «антитело-агонист» или «агонист» взаимозаменяемо обозначают антитело, способное к активации рецептора для индукции полного или частичного опосредованного рецептором ответа. Например, агонист GITR связывается с GITR и индуцирует опосредованную GITR внутриклеточную передачу сигнала (например, увеличенную активацию экспрессии NF-κB). Антитело-агонист стимулирует передачу сигнала посредством GITR подобно природному лиганду, GITR-L. Связывание GITR-L с GITR индуцирует активацию NFκB благодаря деградации IκB. В некоторых вариантах осуществления, антитело-агонист GITR можно идентифицировать по его способности связывать GITR и индуцировать Т-клетки (например, CD8⁺ CTL или CD4⁺ Th-клетки) для пролиферации, выживаемости, цитолитической активности и/или продукции цитокинов (например, IFNγ, IL-10, IL-13, TNFα), или иным образом, как описано в настоящем документе.

[0073] Термины «GITR» или «индуцируемый глюкокортикоидами рецептор фактора некроза опухолей» или «член 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей», или «TNFRSF18» взаимозаменяемо обозначают трансмембранный белок типа I, являющийся членом суперсемейства рецепторов TNF. GITR экспрессируется на высоких уровнях на CD4⁺ CD25⁺ и на активированных эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности GITR известны и опубликованы как No. доступа в GenBank Accession NM_004195.2 → NP_004186.1 (предшественник изоформы 1), SEQ ID NO:1:

```
1  maqhgamgaf  ralcglallc  alslgqrptg  gpgcgpgrrll  lgtgtdarcc
rvhttrccrd
```

```
61  ypgeeccsew  dcmcvqpefh  cgdpccttcr  hhpcppgggv  qsqgkfsfgf
qcidcasgtf
```

```
121 sggheghckp  wtdctqfgfl  tvfpgnkthn  avcvpgsppa  eplgwltvv1
lavaacvlll
```

181 tsaqlglhiw qlrsqcmwpr etqlillevpp stedarscqf peeergersa
eekgrlgdlw

241 v;

NM_148901.1 → NP_683699.1 (предшественник изоформы 2), SEQ
ID NO:2:

1 maqhgamgaf ralcglallc alsigqrptg gpgcgpgrll lgtgtdarcc
rvhttrccrd

61 ypgeeccsew dcmcvqpefh cgdpccttcr hhpcppgqgv qsqgkfsfgf
qcidcasgtf

121 sggheghckp wtdccwrcrr rpktpeaass prksgasdrq rrrggwetcg
cepgrppgpp

181 taaspspgap qaagalrsal grallpwqqk wvqeggsdqr pgpcssaaaa
gpcrreretq

241 swppsslagp dgvgs;

и NM_148902.1 → NP_683700.1 (предшественник изоформы 3),
SEQ ID NO:3:

1 maqhgamgaf ralcglallc alsigqrptg gpgcgpgrll lgtgtdarcc
rvhttrccrd

61 ypgeeccsew dcmcvqpefh cgdpccttcr hhpcppgqgv qsqgkfsfgf
qcidcasgtf

121 sggheghckp wtdctqfgfl tvfpgnkthn avcvpgsppa eplgwltvvl
lavaacvlll

181 tsaqlglhiw qlrktqlille vppstedars cqfpeeerge rsaeekgrlg
dlwv.

См. также No. доступа в GenBank NM_005092 → NP_005083.2.
Структурно, аминокислотная последовательность GITR представляет
собой трансмембранный белок типа I, являющийся членом
суперсемейства рецепторов TNF, который обладает сигнальным
пептидом, внеклеточным доменом (ECD), содержащим три богатых
цистеином домена (CRD), и обладает на протяжении всей длины по
меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,
97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с
аминокислотной последовательностью из номеров доступа в GenBank
NP_004186.1 (SEQ ID NO:1), NP_683699.1 (SEQ ID NO:2),
NP_683700.1 (SEQ ID NO:3) или NP_005083.2. Структурно,
последовательность нуклеиновой кислоты GITR обладает на

протяжении всей длины по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты из номеров доступа в GenBank NM_004195.2, NM_148901.1, NM_148902.1, NM_005092 или SEQ ID NO:1-4. Функционально, агонизм GITR грызунов ингибирует, по меньшей мере временно, супрессорную активность CD25⁺ регуляторных Т-клеток (Treg). Кроме того, агонизм GITR усиливает иммуноактивность, например, пролиферацию, выживаемость, продукцию цитокинов и цитолитическую активность активированных эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. См., например, Nocentini, et al., *Eur J Immunol* (2007) 37:1165-1169; *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-757; Shevach and Stephens, *Nature Reviews Immunology* (2006) 6:613-618.

[0074] «Активность» полипептида по изобретению относится к структурным, регуляторным или биохимическим функциям полипептида в его природной клетке или ткани. Примеры активности полипептида включают в себя как прямую активность, так и опосредованную активность. Иллюстративные виды активности агонизма GITR включают в себя внутриклеточную передачу сигнала, приводящую к увеличенной активации NF-κB, увеличенной пролиферации, выживаемости, продукции цитокинов (например, IFNγ, IL-10, IL-13, TNFα) и цитолитической активности активированных эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Терапевтически, агонизм GITR усиливает противоопухолевые и противовирусные ответы Т-клеток *in vivo*.

[0075] Термин «выделенный», при применении для нуклеиновой кислоты или белка, обозначает, что нуклеиновая кислота или белок являются в основном свободными от других клеточных компонентов, с которыми они ассоциированы в естественном состоянии. Они предпочтительно находятся в гомогенном состоянии. Они могут либо являться сухими, либо представлять собой водный раствор. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют с использованием способов аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, представляющий собой преобладающую молекулу, присутствующую в препарате, является в основном

очищенным. В частности, выделенный ген является отделенным от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белок, отличный от белка, кодируемого представляющим интерес геном. Термин «очищенный» обозначает, что нуклеиновая кислота или белок образует по существу одну полосу в геле для электрофореза. В частности, это означает, что нуклеиновая кислота или белок являются по меньшей мере на 85% чистыми, более предпочтительно, по меньшей мере на 95% чистыми, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере на 99% чистыми.

[0076] Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам либо в одно-, либо в двухцепочечной форме. Если нет конкретных ограничений, термин включает в себя нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают сходными свойствами с эталонной нуклеиновой кислотой и подвергаются метаболизму сходным образом с природными нуклеотидами. Если не указано иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты неявно включает в себя также ее консервативно модифицированные варианты (например, вырожденные замены кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, так же как явно указанную последовательность. Конкретно, вырожденные замены кодонов можно осуществлять посредством получения последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено на остатки смешанных оснований и/или остатки дезоксиинозина (Batzner *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[0077] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» применяют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины применяют для аминокислотных полимеров, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой химический миметик соответствующей природной аминокислоты, так же как для полимеров природных аминокислот и полимеров неприродных аминокислот.

[0078] Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, так же как к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, функционирующим сходным образом с природными аминокислотами. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодированные генетическим кодом, так же как аминокислоты, модифицированные позднее, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, обладающим такой же основной химической структурой, как природная аминокислота, т.е., α -атомом углерода, связанным с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и группой R, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как у природных аминокислот. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые обладают структурой, отличной от основной химической структуры аминокислот, но которые функционируют сходным образом с природной аминокислотой.

[0079] «Консервативно модифицированные варианты» относится как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. По отношению к конкретным последовательностям нуклеиновой кислоты, консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода, большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой данный белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где кодоном определен аланин, кодон может быть изменен на любой из описанных соответствующих кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой

кислоты представляют собой «молчащие варианты», которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариантов. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем документе, которая кодирует полипептид, также описывает молчащие варианты нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид, подразумевают в каждой описанной последовательности.

[0080] Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области понятно, что индивидуальные замены, делеции и добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые изменяют, добавляют или удаляют единственную аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой «консервативно модифицированный вариант», когда изменение приводит к замене аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, представляющие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению.

[0081] Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, являющиеся консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, *Proteins* (1984)).

[0082] «Процент идентичности последовательности» определяют посредством сравнения двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении окна сравнения, где часть

полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е., пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью (например, полипептидом по изобретению), которая не содержит добавлений или делеций, для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают посредством определения количества положений, в которых идентичные основания нуклеиновой кислоты или аминокислотные остатки встречаются в обеих последовательностях, для получения количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательности.

[0083] Термины «идентичная» или процент «идентичности», в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, представляющим собой одинаковые последовательности. Две последовательности являются «в основном идентичными», если две последовательности обладают указанным процентом аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е., по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности на протяжении указанной области, или, если не указано, на протяжении всей последовательности эталонной последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения, или обозначенной области, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или посредством выравнивания вручную и визуального контроля. Изобретение относится к полипептидам или полинуклеотидам, которые являются в основном идентичными полипептидам или полинуклеотидам, соответственно, проиллюстрированным в настоящем документе (например, переменным областям, проиллюстрированным в любой из SEQ ID NO:6-10, 12, 14, 59 и 61; переменным сегментам, проиллюстрированным в любой из SEQ ID NO:16-17; CDR, проиллюстрированным в любой из SEQ ID NO:22-34; FR,

проиллюстрированным в любой из SEQ ID NO:35-50; и последовательностям нуклеиновой кислоты, проиллюстрированным в любой из SEQ ID NO:51-58 и 60). Необязательно, идентичность существует на протяжении области, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 15, 25 или 50 нуклеотидов, или более предпочтительно, на протяжении области, имеющей длину 100-500 или 1000 или более нуклеотидов, или на протяжении всей длины эталонной последовательности. По отношению к аминокислотным последовательностям, идентичность или значительная идентичность может существовать на протяжении области, имеющей длину по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 аминокислот, необязательно, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 25, 30, 35, 40, 50, 75 или 100 аминокислот, необязательно, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 150, 200 или 250 аминокислот, или на протяжении всей длины эталонной последовательности. По отношению к более коротким аминокислотным последовательностям, например, аминокислотным последовательностям из 20 или менее аминокислот, значительная идентичность существует, когда один или два аминокислотных остатка консервативно заменены, в соответствии с консервативными заменами, определенными в настоящем документе.

[0084] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, указывают координаты подпоследовательности, при необходимости, и указывают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию, или указать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности, на основании параметров программы.

[0085] «Окно сравнения», как применяют в настоящем документе, включает в себя ссылку на фрагмент из любого количества смежных положений, выбранного из группы, состоящей из

от 20 до 600, как правило, от приблизительно 50 до приблизительно 200, более обычно, от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью из такого же количества смежных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, посредством алгоритма выравнивания гомологии Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, способом поиска сходства Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, с помощью компьютеризованных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или посредством выравнивания вручную и визуального контроля (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

[0086] Двумя примерами алгоритмов, пригодных для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высоким количеством баллов (HSP) посредством идентификации в исследуемой последовательности коротких слов длиной W , которые либо совпадают, либо удовлетворяют определенному числу баллов положительного порога T при выравнивании со словом такой же длины из базы данных последовательностей. T обозначает порог количества баллов для соседнего слова (Altschul et al., выше). Эти исходные совпадения соседних слов выполняют роль заправки

для начала поисков для выявления более длинных HSP, содержащих их. Совпадения слов продлевают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока суммарное количество баллов выравнивания продолжает увеличиваться. Суммарные баллы рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (вознаграждение за совпадающую пару остатков; всегда > 0) и N (штраф за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей, матрицу баллов используют для расчета суммарного количества баллов. Расширение для совпадения слов в каждом направлении прекращают, когда: суммарное количество баллов выравнивания уменьшается на количество X от своего максимального достигнутого значения; суммарное количество баллов снижается до нуля или ниже, вследствие накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигнут конец любой из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение по обеим цепям. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP программа использует по умолчанию длину слова 3 и ожидание (E) 10, и матрицу баллов BLOSUM62 (см. Henikoff и Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) количество выравниваний (B) 50, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$, и сравнение в двух направлениях.

[0087] Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Одним из измерений сходства, которое обеспечивает алгоритм BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая является показателем вероятности того, что совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей происходит случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если эта наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно

0,2, более предпочтительно, менее приблизительно 0,01, и наиболее предпочтительно, менее приблизительно 0,001.

[0088] Показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются в основном идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реактивностью с антителами, полученными против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является в основном идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что эти две молекулы или комплементарные им молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях, как описано ниже. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что одни и те же праймеры можно использовать для амплификации последовательности.

[0089] Термин «связь», при применении в контексте того, как антигенсвязывающие области соединены внутри связывающей G1TR молекулы по этому изобретению, включает в себя все возможные способы физического соединения областей. Множество антигенсвязывающих областей часто соединяют химическими связями, такими как ковалентная связь (например, пептидная связь или дисульфидная связь) или нековалентная связь, которые могут представлять собой либо прямую связь (т.е., без линкера между двумя антигенсвязывающими областями), либо непрямую связь (т.е., с помощью по меньшей мере одной линкерной молекулы между двумя или более антигенсвязывающими областями).

[0090] Термины «субъект», «пациент» и «индивидуум» взаимозаменяемо относятся к млекопитающему, например, человеку или млекопитающему из не относящихся к человеку приматов. Млекопитающее может представлять собой также лабораторное млекопитающее, например, мышь, крысу, кролика, хомяка. В некоторых вариантах осуществления, млекопитающее может представлять собой сельскохозяйственное млекопитающее (например,

лошадиное, овечье, бычье, свиное, верблюдовое) или домашнее млекопитающее (например, собачье, кошачье).

[0091] Как применяют в настоящем документе, термины «лечить», «лечение» или «излечение» любого заболевания или нарушения в одном варианте осуществления относится к облегчению заболевания или нарушения (т.е., замедлению или аресту, или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления, «лечить», «лечение», или «излечение» относится к смягчению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут являться неразличимыми пациентом. В другом варианте осуществления, «лечить», «лечение» или «излечение» относится к модуляции заболевания или нарушения, физически (например, стабилизации различного симптома), физиологически (например, стабилизации физического параметра) или обоими способами. В другом варианте осуществления, «лечить», «лечение» или «излечение» относится к предотвращению или отсрочке начала или развития, или прогрессирования заболевания или нарушения.

[0092] Термин «терапевтически приемлемое количество» или «терапевтически эффективная доза» взаимозаменяемо относятся к количеству, достаточному для обеспечения желательного результата (т.е., уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, предотвращения метастазирования, ингибирования или предотвращения вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекции). В некоторых вариантах осуществления, терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательных побочных эффектов. Терапевтически приемлемое количество можно определять посредством введения сначала низкой дозы, и затем постепенного увеличения этой дозы до достижения желательного эффекта. «Профилактически эффективная доза» и «терапевтически эффективная доза» агонистического антитела против GITR по изобретению может предотвращать начало, или приводить к уменьшению тяжести, соответственно, симптомов заболевания, включая симптомы, ассоциированные со злокачественной опухолью или инфекционным заболеванием.

[0093] Термин «совместное введение» относится к

одновременному присутствию двух действующих веществ в крови индивидуума. Действующие вещества, которые вводят совместно, можно вводить одновременно или последовательно.

[0094] Как применяют в настоящем документе, фраза «в основном состоящий из» относится к типам или видам активных лекарственных средств, включенных в способ или композицию, так же как к любым неактивным носителям или наполнителям для намеченного применения способов или композиций. В некоторых вариантах осуществления, фраза «в основном состоящий из» в явной форме исключает включение одного или нескольких дополнительных действующих веществ, отличных от агонистического антитела против GITR по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, фраза «в основном состоящий из» в явной форме исключает включение одного или нескольких дополнительных действующих веществ, отличных от агонистического антитела против GITR по изобретению и второго совместно вводимого средства.

[0095] Термины «ассоциированный со злокачественной опухолью антиген» или «опухолеассоциированный антиген» или «опухолеспецифический маркер» или «маркер опухоли» взаимозаменяемо относятся к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая предпочтительно экспрессируется на поверхности клетки злокачественной опухоли по сравнению с нормальной клеткой, и которую можно использовать для предпочтительного нацеливания лекарственного средства на клетки злокачественной опухоли. Часто, ассоциированный со злокачественной опухолью антиген представляет собой молекулу поверхности клетки с увеличенной экспрессией в клетке злокачественной опухоли по сравнению с нормальной клеткой, например, с экспрессией, увеличенной в 1 раз, с экспрессией, увеличенной в 2 раза, с экспрессией, увеличенной в 3 раза или более, по сравнению с нормальной клеткой. Часто, ассоциированный со злокачественной опухолью антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, несоответствующим образом синтезируемую в клетке злокачественной опухоли, например, молекулу, содержащую делеции, добавления или мутации по сравнению с молекулой, экспрессированной на нормальной клетке. Часто, ассоциированный

со злокачественной опухолью антиген экспрессируется исключительно на клеточной поверхности клетки злокачественной опухоли и не синтезируется или не экспрессируется на поверхности нормальной клетки. Иллюстративные маркеры поверхности клеток опухоли включают в себя белки c-erbB-2 и рецептор эпидермального фактора роста человека (HER) для рака молочной железы, PSMA для рака предстательной железы, и углеводы муцинов для многих злокачественных опухолей, включая злокачественные опухоли молочной железы, яичников и колоректальные злокачественные опухоли.

[0096] Как применяют в настоящем документе, термины «первый», «второй», «третий» и «четвертый», по отношению к антигенсвязывающим группам, например, Fab, используют для удобства их различения, когда присутствует более одной из каждой группы. Применение этих терминов не предназначено для придания определенного порядка или ориентации антитела, если не указано иначе.

[0097] Неконкретизированные и конкретизированные термины в единственном числе включают в себя ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иного.

Агонистические антитела против GITR

[0098] Настоящее изобретение относится к антителам, фрагментам антител и антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с GITR и стимулируют передачу сигнала посредством GITR, и/или индуцируют усиленный иммунный ответ *in vivo*. Антитела, фрагменты антител и антигенсвязывающие молекулы находят применение для усиления ответов CD4+ Т-помощников (Th) и/или CD8+ цитолитических Т-лимфоцитов (CTL) против антигена-мишени. Они находят применение также в лечении состояний заболевания, прогрессирование которых можно обращать или ингибировать посредством эффективного иммунного ответа, включая злокачественные опухоли и инфекционные заболевания.

[0099] Антитела, фрагменты антител и антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению обладают подходящими свойствами для применения для пациентов-людей, например, они обладают низким риском проблем с иммуногенностью при применении

для человека (они кодированы человеческими зародышевыми последовательностями нуклеиновой кислоты, за исключением определяющих специфичность связывания областей (BSD), в частности, по меньшей мере CDR3); обладают высокой аффинностью для GITR (например, K_D составляет по меньшей мере менее 5 нМ); не вступают в перекрестную реакцию с другими членами суперсемейства TNFR; вступают в перекрестную реакцию с GITR человека и GITR не относящихся к человеку приматов; и проявляют агонизм к передаче сигналов посредством GITR в низких дозах (например, в концентрациях менее 5 нМ в анализах *in vitro*). Другие виды активности и характеристики также указаны на протяжении описания.

[0100] Соответственно, настоящее изобретение относится к антителам, фрагментам антител и антигенсвязывающим молекулам, являющимся агонистами GITR. Представленные антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR содержат последовательность минимальной детерминанты специфичности связывания (BSD) внутри CDR3 тяжелых и легких цепей, полученные из исходного или эталонного моноклонального антитела, например, антител, описанных в таблице 1 и таблице 2 ниже. Оставшиеся последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи (CDR и FR), например, V-сегмент и J-сегмент, происходят из соответствующих человеческих зародышевых и подвергнутых аффинному созреванию аминокислотных последовательностей. V-сегменты можно выбирать из библиотеки человеческих V-сегментов. Дальнейшее уточнение последовательности можно осуществлять посредством аффинного созревания или других способов, известных в данной области для оптимизации активности связывания или активности антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих молекул по изобретению.

[0101] В другом варианте осуществления, тяжелые и легкие цепи антител или фрагментов антител против GITR содержат человеческий V-сегмент из соответствующей человеческой зародышевой последовательности (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3), например, выбранный из библиотеки человеческих V-сегментов, и фрагмент последовательности CDR3-FR4 из исходного

моноклонального антитела (например, антител, как описано в таблице 1 и таблице 2). Фрагмент последовательности CDR3-FR4 можно далее уточнять посредством замены фрагментов последовательности на соответствующие человеческие зародышевые последовательности и/или посредством аффинного созревания. Например, последовательность FR4 и/или CDR3, окружающую BSD, можно заменять на соответствующую человеческую зародышевую последовательность, в то время как BSD из CDR3 исходного моноклонального антитела сохраняют.

[0102] В некоторых вариантах осуществления, соответствующая человеческая зародышевая последовательность для V-сегмента тяжелой цепи представляет собой VH3 3-13/30: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK (SEQ ID NO:89). В одном варианте осуществления, последняя аминокислота в SEQ ID NO:89, лизин («K»), заменена на аргинин («R»). В некоторых вариантах осуществления, соответствующая человеческая зародышевая последовательность для J-сегмента тяжелой цепи представляет собой JH4. В некоторых вариантах осуществления, J-сегмент тяжелой цепи содержит частичную человеческую зародышевую последовательность JH4 WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:90). Полноразмерный J-сегмент из человеческой зародышевой JH4 представляет собой YFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:91). Гены вариабельной области обозначены в соответствии со стандартной номенклатурой генов вариабельной области иммуноглобулинов. Современная информация о генах иммуноглобулинов доступна во всемирной web-сети, например, в базах данных ImMunoGeneTics (IMGT), V-base и PubMed. См. также Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(2):100-16; Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(3):161-74; Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(4):242-54; и Giudicelli, et al., *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D256-61.

[0103] В некоторых вариантах осуществления, соответствующая человеческая зародышевая последовательность для V-сегмента легкой цепи представляет собой VKIII L16/A27: EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSG

SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP (SEQ ID NO:92). В некоторых вариантах осуществления, соответствующая человеческая зародышевая последовательность для J-сегмента легкой цепи представляет собой JK2. В некоторых вариантах осуществления, J-сегмент легкой цепи содержит частичную человеческую зародышевую последовательность Jk2 FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:93). Полноразмерный J-сегмент из человеческой зародышевой Jk2 представляет собой YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:94).

[0104] В некоторых вариантах осуществления, V-сегмент тяжелой цепи обладает по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью

(E/Q) VQLVESGGGLVQ (P/S) GGSLRLSCAASGFSLSYGV DWVRQAPGKGLEW (L/V) GVIW GGGGTY (A/T) (A/S) S (L/V) M (A/G) RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA (K/R) (H/N) AYGH DGGFAM DYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:16).

[0105] В некоторых вариантах осуществления, V-сегмент легкой цепи обладает по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS (E/Q) SVSSN (L/V) AWYQQ (K/R) PGQAPRLLIYGAS NRATGIP (D/A) RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:17).

[0106] В некоторых вариантах осуществления, i) CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HAYGH DGGFAM DY (SEQ ID NO:29) или NAYGH DGGFAM DY (SEQ ID NO:109); и ii) CDR3 переменной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность GQSYSPFT (SEQ ID NO:34) или SYSPF (SEQ ID NO:83).

[0107] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител по изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYGVD (SEQ ID NO:22) или GFSLSY (SEQ ID NO:84); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VIWGGGGTY (A/T) (A/S) S (L/V) M (A/G) (SEQ ID NO:28) или WGGG (SEQ ID NO:80); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HAYGH DGGFAM DY (SEQ ID NO:29) или NAYGH DGGFAM DY (SEQ ID NO:109).

[0108] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител по изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность RAS(E/Q)SVSSN(L/V)A (SEQ ID NO:32) или S(E/Q)SVSSN (SEQ ID NO:87); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASNRAT (SEQ ID NO:33) или GAS (SEQ ID NO:82); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GQSYSPFT (SEQ ID NO:34) или SYSPF (SEQ ID NO:83).

[0109] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител по изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYGVD (SEQ ID NO:22) или GFSLSSY (SEQ ID NO:84); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VIWGGGGTY(A/T)(A/S)S(L/V)M(A/G) (SEQ ID NO:28) или WGGGG (SEQ ID NO:80); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO:29) или NAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO:109). Такие антитела или фрагменты антител по изобретению дополнительно содержат переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность RAS(E/Q)SVSSN(L/V)A (SEQ ID NO:32) или S(E/Q)SVSSN (SEQ ID NO:87); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASNRAT (SEQ ID NO:33), или GAS (SEQ ID NO:82); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GQSYSPFT (SEQ ID NO:34) или SYSPF (SEQ ID NO:83).

[0110] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител по изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYGVD (SEQ ID NO:22) или GFSLRSY (SEQ ID NO:79); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VIWGGGGTNYNSALMA (SEQ ID NO:62) или WGGGG (SEQ ID NO:80); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO:29) или NAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO:109). В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител являются гуманизированными.

[0111] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител по изобретению содержат переменную область

легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KASENVDTFVS (SEQ ID NO:63) или SENVDTF (SEQ ID NO:81); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASNRYT (SEQ ID NO:64) или GAS (SEQ ID NO:82); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GQSYSYPFT (SEQ ID NO:34) или SYSYPF (SEQ ID NO:83). В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител являются гуманизированными.

[0112] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител по изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYGVD (SEQ ID NO:22) или GFSLRSY (SEQ ID NO:79); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VIWGGGGTNYNSALMA (SEQ ID NO:62) или WGGGG (SEQ ID NO:80); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO:29) или NAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO:109). Такие антитела или фрагменты антител дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KASENVDTFVS (SEQ ID NO:63) или SENVDTF (SEQ ID NO:81); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASNRYT (SEQ ID NO:64) или GAS (SEQ ID NO:82); и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GQSYSYPFT (SEQ ID NO:34) или SYSYPF (SEQ ID NO:83). В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител являются гуманизированными.

[0113] В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность (E/Q)VQLVESGGGLVQ(P/S)GGSLRLSCAASGFSL (SEQ ID NO:37); FR2, содержащую аминокислотную последовательность WVRQAPGKGLEW(L/V)G (SEQ ID NO:40); FR3, содержащую аминокислотную последовательность RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA(K/R) (SEQ ID NO:41); и FR4, содержащую аминокислотную последовательность WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:42). В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSL

(SEQ ID NO:35) и QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS (SEQ ID NO:36); FR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:38) и WVRQAPGKGLEWLG (SEQ ID NO:39); FR3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:41; и FR4, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:42. Идентифицированные аминокислотные последовательности могут иметь одну или несколько замененных аминокислот (например, при аффинном созревании), или одну или две консервативно замененные аминокислоты.

[0114] В некоторых вариантах осуществления, переменная область легкой цепи содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:43); FR2, содержащую аминокислотную последовательность WYQQ(K/R)PGQAPRLLIY (SEQ ID NO:46); FR3, содержащую аминокислотную последовательность GIP(A/D)RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:49); и FR4, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:50. В некоторых вариантах осуществления, переменная область легкой цепи содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:43; FR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из WYQQRPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:44) и WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:45); FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:47) и GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:48); и FR4, содержащую аминокислотную последовательность FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:50). Идентифицированные аминокислотные последовательности могут иметь одну или несколько замененных аминокислот (например, при аффинном созревании), или одну или две консервативно замененные аминокислоты.

[0115] На протяжении их полной длины, переменные области антител против GITR по настоящему изобретению, как правило, обладают суммарной идентичностью аминокислотной последовательности переменной области (например, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) по меньшей мере приблизительно 85%, например, по меньшей мере приблизительно 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с соответствующей

человеческой зародышевой аминокислотной последовательностью вариабельной области. Например, тяжелая цепь антител против GITR может обладать по меньшей мере приблизительно 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с человеческой зародышевой вариабельной областью EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK-YFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:89 и 91) (VH3 3-13/30+CDR3+JH4, где дефис представляет собой CDR3, которая может иметь разную длину). В одном варианте осуществления, последняя аминокислота в SEQ ID NO:89, лизин (K), заменена на аргинин (R). Легкая цепь антител против GITR может обладать по меньшей мере приблизительно 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с человеческой зародышевой вариабельной областью EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC-YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NOS:98 и 94) (VKIII L16/A27+CDR3+JK2; где дефис представляет собой CDR3, которая может иметь разную длину). В некоторых вариантах осуществления, только аминокислоты внутри каркасных областей добавляют, делетируют или заменяют. В некоторых вариантах осуществления, из сравнения идентичности последовательностей исключают CDR3.

Таблица 1. Примеры агонистических антител против GITR по настоящему изобретению.

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательности или полинуклеотида (PN)	Последовательность
61: VH, MAB1	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLRSYGVDWVRQPPGKGLEWLGVIW GGGGTNYNSALMAKLSISKDKSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGT SVTVSS

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательности или полинуклеотида (PN)	Последовательность
59: VL, MAB1	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCKASENVDTFVSWYQQKPDHSPKLLIYGAS NRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQSYSPFTFGSGTKL EIK
60: PN для VH MAB1, кодирующий SEQ ID NO: 61 (VH)	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC TGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGGTTTTTCATTAAGGAGCTATGGTGTAGA CTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACAAATTATAATTCAGCTCTCATGGCCAAACTGAGTATCA GCAAAGACAAGTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAAC TGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAAACATGCCTATGGTCACGACGGC GGTTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
58: PN для VL MAB1, кодирующий SEQ ID NO: 59 (VL)	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGA GGGTCACTTGAGCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGATACTTTTGTATCCTG GTATCAACAGAAACCAGACCACTCTCCTAAACTACTGATATACGGGGCATCC AACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAG ATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGCAGATTATCA CTGTGGACAGAGTTACAGCTATCCATTACGTTCTGGCTCGGGGACAAAGTTG GAAATAAAA
6: VH, MAB2	QVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWVGVIW GGGGTYIASSVMARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGLTVTVSS
7: VL, MAB2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIK

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
65: Тяжелая цепь, MAB2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKGLEWVGVIW GGGGTYIYASSVMARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: Легкая цепь, MAB2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
51: PN для VH MAB2, кодирующий SEQ ID NO: 6	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTGTGCATGGCCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL MAB2, кодирующий SEQ ID NO: 7	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA CTGCGGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAG

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
67: PN для HC MAB2, кодирующий SEQ ID NO: 65	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTGTGCATGGCCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGC AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
68: PN для LC MAB2, кодирующий SEQ ID NO: 66	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC
8: VH, MAB3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKLEWLGVIW GGGGTYYTASLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSS
9: VL, MAB3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS NRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIK
69: Тяжелая цепь, MAB3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKLEWLGVIW GGGGTYYTASLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
70: Легкая цепь, MAB3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS NRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
53: PN для VH MAB3, кодирующий SEQ ID NO: 8	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTGCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
54: PN для VL MAB3, кодирующий SEQ ID NO: 9	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTACTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAA

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
71: PN для HC МАВЗ, кодирующий SEQ ID NO: 69	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTGCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
72: PN для LC MAB3, кодирующий SEQ ID NO: 70	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTACTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC
10: VH, MAB4	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKGLEWVGVIW GGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIK
73: Тяжелая цепь, MAB4	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKGLEWVGVIW GGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
66: Легкая цепь, MAB4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
55: PN для VH MAB4, кодирующий SEQ ID NO: 10	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTCTCATGGGCAGATTACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL MAB4, кодирующий SEQ ID NO: 7	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTACTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAG

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
74: PN для HC МАВ4, кодирующий SEQ ID NO: 73	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATAAGACCAACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
68: PN для LC MAB4, кодирующий SEQ ID NO: 66	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC
12: VH, MAB5	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKLEWLGVIW GGGGTYITSSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB5	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIK
75: Тяжелая цепь, MAB5	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKLEWLGVIW GGGGTYITSSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Последовательность
описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	
66: Легкая цепь, MAB5	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDHKLQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
56: PN для VH MAB5, кодирующий SEQ ID NO: 12	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL MAB5, кодирующий SEQ ID NO: 7	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAG

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
76: PN для HC MAB5, кодирующий SEQ ID NO: 75	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
68: PN для LC MAB5, кодирующий SEQ ID NO: 66	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC
14: VH, MAB6	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWLGVIW GGGGTYYTSSLMARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB6	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIK
77: Тяжелая цепь, MAB6	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWLGVIW GGGGTYYTSSLMARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
66: Легкая цепь, MAB6	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
57: PN для VH MAB6, кодирующий SEQ ID NO: 14	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGCCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL MAB6, кодирующий SEQ ID NO: 7	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAG

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
78: PN для HC МАВ6, кодирующий SEQ ID NO: 77	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGCCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
68: PN для LC MAB6, кодирующий SEQ ID NO: 66	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC
99: VH, MAB7	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKLEWVGVIW GGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB7	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIK
100: Тяжелая цепь, MAB7	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKLEWVGVIW GGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
66: Лёгкая цепь, MAB7	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
101: PN для VH MAB7, кодирующий SEQ ID NO: 99	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGTCCGGCGGCTCTC TGAGACTGTCTTGCCTGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCTCTTACGGCGTGGA CTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTGG GGCGGAGGCGGCACCTACTACGCTCTTCCCTGATGGGCGCGTTACCATCT CCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGC CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGCCTACGGCCACGACGGC GGCTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTCTCC
102: PN для VL MAB7, кодирующий SEQ ID NO: 7	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA GAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCTCTCCAACGTGGCCTG GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCGGGCCAGTCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAG

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
103: PN для HC MAV7, кодирующий SEQ ID NO: 100	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGTCCGGCGGCTCTC TGAGACTGTCTTGCGCTGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCTCTTACGGCGTGGA CTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTGG GGCGGAGGCGGCACCTACTACGCCTCTTCCCTGATGGGCCGGTTACCATCT CCCGGGACAACCTCCAAGAACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGC CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGCCTACGGCCACGACGGC GGCTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTCTCCG CTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTAC TTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACAGTGTCTTGGAACCTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCTGTTCCTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAA G

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
104: PN для LC MAB7, кодирующий SEQ ID NO: 66	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCCGCCACCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA GAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCCTCCAACGTGGCCTG GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATCTCCCGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCGGCCAGTCTACTCATAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC
105: VH, MAB8	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWVGVIW GGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB8	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIK
106: Тяжелая цепь, MAB8	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWVGVIW GGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNAYGHDG GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Последовательность
описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	
66: Легкая цепь, MAB8	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
107: PN для VH MAB8, кодирующий SEQ ID NO: 105	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGTCAGGCGGTAGCC TGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGGCTTTAGCCTGTCTAGCTACGGCGTGGA CTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCCGAGTGATCTGG GGCGGAGGCGGAACCTACTACGCTCTAGCCTGATGGGCGCGTTCACTATCT CTAGGGACAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCACTGAGAGC CGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAAACGCCTACGGTCACGACGGC GGCTTCGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGAGTTCA
102: PN для VL MAB8, кодирующий SEQ ID NO: 7	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA GAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCTCCAACGTGGCCTG GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCGGGCCAGTCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAG

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательно сти или полинуклеотида (PN)	Последовательность
108: PN для HC MAV8, кодирующий SEQ ID NO: 106	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGTCAGGCGGTAGCC TGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCTTTAGCCTGTCTAGCTACGGCGTGGA CTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTTCGGAGTGATCTGG GGCGGAGGCGGAACCTACTACGCCTCTAGCCTGATGGGCCGGTTCACTATCT CTAGGGACAACCTCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCACTGAGAGC CGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAAACGCCTACGGTCACGACGGC GGCTTCGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGAGTTCAG CTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTAC TTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACAGTGTCTTGGAACCTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAA G

SEQ ID NO: описание аминокислотной последовательности или полинуклеотида (PN)	Последовательность
104: PN для LC MAB8, кодирующий SEQ ID NO: 66	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA GAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCTCCAACGTGGCCTG GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATCTCCCGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCGGCCAGTCTACTCATAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC

[0116] CDR антител, перечисленных в таблице 1, можно определять посредством хорошо известных систем нумерации, известны в данной области, включая системы, описанные в настоящем документе. В таблице 2 перечислены CDR, определенные (1) с использованием системы нумерации, описанной в Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации «Kabat»), Публикация NIH No. 91-3242; и (2) Chothia, см. Al-Lazikani et al., (1997) «Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins», J.Mol.Biol. 273:927-948.

Таблица 2: Сравнение CDR по Kabat и Chothia

CDR	SEQ ID NO: CDR по Kabat (Kabat et al., 1991)	SEQ ID NO: CDR по Chothia (Al-Laikani et al., 1997)
MAB1 CDRH1	22: SYGVD	79: GFSLRSY
MAB1 CDRH2	62: VIWGGGGTNYNSALMA	80: WGGGG

CDR	SEQ ID NO: CDR no Kabat (Kabat et al., 1991)	SEQ ID NO: CDR no Chothia (Al-Laikani et al., 1997)
MAB1 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB1 CDRL1	63: KASENVDTFVS	81: SENVDTF
MAB1 CDRL2	64: GASNRYT	82: GAS
MAB1 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF
MAB2 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB2 CDRH2	23: VIWGGGGTYTASSVMA	80: WGGGG
MAB2 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB2 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB2 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB2 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF
MAB3 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB3 CDRH2	24: VIWGGGGTYTASLMG	80: WGGGG
MAB3 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB3 CDRL1	31: RASQSVSSNLA	86: SQSVSSN
MAB3 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB3 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF
MAB4 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB4 CDRH2	25: VIWGGGGTYTASSLMG	80: WGGGG
MAB4 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB4 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB4 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB4 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF
MAB5 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB5 CDRH2	26: VIWGGGGTYTSSLMG	80: WGGGG
MAB5 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB5 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB5 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB5 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF
MAB6 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB6 CDRH2	27: VIWGGGGTYTSSLMA	80: WGGGG
MAB6 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB6 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB6 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB6 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF

CDR	SEQ ID NO: CDR по Kabat (Kabat et al., 1991)	SEQ ID NO: CDR по Chothia (Al-Laikani et al., 1997)
MAB7 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB7 CDRH2	25: VIWGGGGTTYASSLMG	80: WGGGG
MAB7 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB7 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB7 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB7 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF
MAB8 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB8 CDRH2	25: VIWGGGGTTYASSLMG	80: WGGGG
MAB8 CDRH3	109: NAYGHDGGFAMDY	109: NAYGHDGGFAMDY
MAB8 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB8 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB8 CDRL3	34: GQSYSYPFT	83: SYSYPF

[0117] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению, связывающие GITR (например, SEQ ID NO:1, подвергнутый процессингу в клетке SEQ ID NO:1), выбраны из любого из: i) антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где: CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:23, CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29, CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33 и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34; ii) антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где: CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:24, CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29, CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:31, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33 и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34; iii) антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где: CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25, CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29, CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33 и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34; iv) антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где: CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:26, CDR3 тяжелой

цепи содержит SEQ ID NO:29, CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34; v) антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где: CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:27, CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29, CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33 и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34; и vi) антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где: CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25, CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:109, CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34. В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител являются гуманизированными. В конкретных вариантах осуществления антитела или фрагменты антител содержат человеческую константную область. В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты антител содержат область Fc IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты антител являются модифицированными или являются экспрессированными в модифицированной клетке, где такая модификация приводит к усиленной эффекторной функции по отношению к FcR антитела или фрагмента антитела. В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент индуцирует увеличенное соотношение Тэфф:Трег *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела индуцирует усиленный иммунный ответ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, когда антитело или фрагмент антитела является перекрестно сшитым со вторым антителом или фрагментом антитела, оно представляет собой агонист SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

[0118] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной

последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:16, и содержат вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи из SEQ ID NO:17.

[0119] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:6, и содержат вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи из SEQ ID NO:7.

[0120] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:8, и содержат вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи из SEQ ID NO:9.

[0121] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:10, и содержат вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи из SEQ ID NO:7.

[0122] В некоторых вариантах осуществления, антитела или

фрагменты антител против GITR по изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:12, и содержат переменную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью легкой цепи из SEQ ID NO:7.

[0123] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат полипептид тяжелой цепи, обладающий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:14, и содержат полипептид легкой цепи, обладающий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью легкой цепи из SEQ ID NO:7.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:99, и содержат переменную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью легкой цепи из SEQ ID NO:7.

[0125] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с переменной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:105, и содержат переменную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи из SEQ ID NO:7.

[0126] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат полипептид тяжелой цепи, обладающий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO:61, и содержат полипептид легкой цепи, обладающий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи из SEQ ID NO:59.

[0127] На протяжении их полной длины, антитела против GITR по настоящему изобретению, как правило, обладают суммарной идентичностью аминокислотной последовательности константной области (например, IgG1) по меньшей мере приблизительно 85%, например, по меньшей мере приблизительно 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотными последовательностями константной области IgG1/карпа человека. Например, тяжелая цепь антител против GITR может обладать по меньшей мере приблизительно 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с константной областью

IgG1

человека

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:20). В одном варианте осуществления, обозначенные жирным шрифтом остатки лейцин/лейцин заменены на аланин/аланин. В одном варианте осуществления, последняя аминокислота, лизин (K), заменена на аргинин (R). Легкая цепь антител против GITR может обладать по меньшей мере приблизительно 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с константной областью человеческой легкой цепи

каппа
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:21). В некоторых вариантах осуществления, аминокислоты внутри константных областей добавлены, deletированы или заменены.

[0128] В некоторых вариантах осуществления, такое антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. Последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности) можно «смешивать и комбинировать» для получения других связывающих GITR антител по изобретению. Такие «смешанные и комбинированные» связывающие GITR антитела можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в данной области (например, ELISA и других анализов, описанных в разделе примеры), для подтверждения активности. Когда цепи смешивают и комбинируют, последовательность VH из конкретной пары VH/VL следует заменять на структурно сходную последовательность VH. Подобным образом, полноразмерную последовательность тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь следует заменять на структурно сходную полноразмерную последовательность тяжелой цепи. Подобным образом, последовательность VL из конкретной пары VH/VL следует заменять на структурно сходную последовательность VL. Подобным образом, полноразмерную последовательность легкой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь следует заменять на структурно сходную полноразмерную последовательность легкой цепи. Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или фрагменту антитела, обладающему: вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, 8, 10, 12, 14, 99 и 105; и вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную

последовательность выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и 9; где антитело специфически связывается с GITR.

[0129] В некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат полипептид тяжелой цепи, обладающий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с последовательностью тяжелой цепи, выбранной из любой из SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:106; и содержат полипептид легкой цепи, обладающий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с легкой цепью из SEQ ID NO:66 или SEQ ID NO:70. В конкретных вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат полипептид тяжелой цепи, выбранный из любой из SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:106; и содержат полипептид легкой цепи из SEQ ID NO:66 или SEQ ID NO:70.

[0130] В случае идентифицированных аминокислотных последовательностей длиной менее 20 аминокислот, они могут являться устойчивыми к одной или двум консервативным заменам аминокислот, в то же время сохраняя желательные специфическое связывание и/или агонистическую активность.

[0131] Антитела и фрагменты антител против GITR по настоящему изобретению, как правило, связывают GITR, включая 1 (SEQ ID NO:1), изоформу 2 (SEQ ID NO:2) и изоформу 3 (SEQ ID NO:3), с равновесной константой диссоциации (K_D) менее приблизительно 10^{-8} М или 10^{-9} М, например, или менее приблизительно 10^{-10} М или 10^{-11} М, и в некоторых вариантах осуществления, менее приблизительно 10^{-12} М или 10^{-13} М.

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом

[0132] Настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител, которые связываются с эпитопом, содержащим богатый цистеином домен 1 («CRD1», SEQ ID NO:4: CGPGRLLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDC) и богатый цистеином домен 2 («CRD2», SEQ ID NO:5:

MCVQPEFHCGDPCSTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQC) из GITR человека, и где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула представляет собой агонист hGITR, и где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула, необязательно, обладают интактной или усиленной эффекторной функцией по отношению к FcR. В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связывается с эпитопом, содержащим SEQ ID NO:88) из GITR человека. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит остатки в пределах SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки в пределах остатков 34-72 и 78 из GITR человека, где такие антитела и фрагменты антител являются агонистами hGITR.

[0133] Настоящее изобретение также относится к антителам и фрагментам антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и связывающие GITR антитела, описанные в таблице 1. Дополнительные антитела и фрагменты антител можно, таким образом, идентифицировать на основании их способности проявлять перекрестную конкуренцию (например, конкурентно ингибировать связывание, статистически значимым образом) с другими антителами по изобретению в анализах связывания GITR. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител и фрагментов антител по настоящему изобретению с белком GITR (например, GITR человека) показывает, что тестируемое антитело может конкурировать с этим антителом или фрагментом антитела за связывание с hGITR; такое антитело может, согласно неограничивающей теории, связываться с тем же самым или родственным (например, структурно сходным или пространственно близким) эпитопом на белке GITR, что и антитело или фрагмент антитела, с которыми оно конкурирует. В конкретном варианте осуществления, антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом на hGITR, что и антитела или фрагменты антител по настоящему изобретению, представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело. Такие человеческие или гуманизированные моноклональные антитела можно получать и выделять, как описано в настоящем документе.

Сконструированные и модифицированные антитела

[0134] Антитело или фрагмент антитела по изобретению, кроме того, можно получать с использованием антитела, обладающего одной или несколькими из последовательностей CDR и/или VH, и/или VL, показанных в настоящем документе (например, таблица 1) в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела или фрагмента антитела, где модифицированное антитело может обладать измененными свойствами по сравнению с исходным антителом. Антитело или фрагмент антитела можно конструировать посредством модификации одного или нескольких остатков внутри одной или обеих переменных областей (т.е., VH и/или VL), например, внутри одной или нескольких областей CDR и/или внутри одной или нескольких каркасных областей. Дополнительно или альтернативно, антитело или фрагмент антитела можно конструировать посредством модификации остатков внутри константной области(областей), например, для изменения эффекторной функции(функций) антитела.

[0135] Одним из типов конструирования переменной области, который можно осуществлять, является прививка CDR. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, локализованные в шести определяющих комплементарность областях тяжелой и легкой цепи (CDR). По этой причине, аминокислотные последовательности внутри CDR обладают большим разнообразием между индивидуальными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR являются ответственными за большинство взаимодействий антитело-антиген, является возможным экспрессировать рекомбинантные антитела, имитирующие свойства специфического антитела, посредством конструирования экспрессирующих векторов, включающих последовательности CDR из специфического антитела, привитые в каркасные последовательности из другого антитела с отличными свойствами (см., например, Riechmann, L. *et al.*, 1998 *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.*, 1986 *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.*, 1989 *Proc. Natl. Acad., U.S.A.* 86:10029-10033; Патент США No. 5225539 от Winter и Патенты США No. 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 от Queen *et al.*).

[0136] Соответственно, другой вариант осуществления изобретения относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1, обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:22, 79, и 84; последовательности CDR2, обладающие аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:23, 24, 25, 26, 27, 62, и 80; последовательности CDR3, обладающие аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, 34 и 109, соответственно; и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, обладающие аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:30, 31, 63, 81, 85 и 86; последовательности CDR2, обладающие аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:33, 64, и 82; и последовательности CDR3, состоящие из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:34 и 83; соответственно. Таким образом, такие антитела содержат последовательности CDR VH и VL из моноклональных антител, но все еще могут содержать каркасные последовательности, отличные от этих антител. В конкретных вариантах осуществления, выделенные антитела или фрагменты антител содержат последовательности, обладающие идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с соответствующими последовательностями в этом разделе.

[0137] Такие каркасные последовательности можно получать из публично доступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, включающих в себя зародышевые последовательности генов антител. Например, зародышевые последовательности ДНК для генов переменной области человеческих тяжелых и легких цепей можно обнаружить в базе данных человеческих зародышевых последовательностей «VBase» (доступной в Internet на www.mrc-sre.cam.ac.uk/vbase), так же как в Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition,

U.S. Department of Health и Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. fol. Biol. 227:776-798; и Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836.

[0138] Примерами каркасных последовательностей для применения в антителах по изобретению являются последовательности, структурно сходные с каркасными последовательностями, используемыми в избранных антителах по изобретению, например, консенсусные последовательности и/или каркасные последовательности, используемые в моноклональных антителах по изобретению. Последовательности CDR1, 2 и 3 VH, и последовательности CDR1, 2 и 3 VL, можно прививать в каркасные области, обладающие последовательностью, идентичной с обнаруженной в зародышевом гене иммуноглобулина, из которого происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR можно прививать в каркасные области, содержащие одну или несколько мутаций по сравнению с зародышевыми последовательностями. Например, обнаружено, что в конкретных случаях является преимущественным подвергать мутации остатки внутри каркасных областей для сохранения или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см., например, Патенты США No. 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 от Queen et al).

[0139] Другим типом модификации вариабельной области является мутагенез аминокислотных остатков внутри областей CDR1, CDR2, и/или CDR3 VH и/или VL, чтобы таким образом улучшить одно или несколько свойств связывания (например, аффинность) представляющего интерес антитела, известный как «аффинное созревание». Можно выполнять сайт-специфический мутагенез или опосредованный ПЦР мутагенез для введения мутации(мутаций), и воздействие на связывание антитела, или другое представляющее интерес функциональное свойство, можно оценивать в анализах *in vitro* или *in vivo*, как описано в настоящем документе и представлено в примерах и/или в альтернативных или дополнительных анализах, известных в данной области. Можно вводить консервативные модификации. Мутации могут представлять собой замены, добавления или делеции аминокислот. Более того, как правило, изменяют не более одного, двух, трех, четырех или

пяти остатков внутри области CDR.

[0140] Сконструированные антитела или фрагменты антител по изобретению включают в себя те, в которых модификации выполнены в каркасных остатках внутри VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркаса выполняют для уменьшения иммуногенности антитела. Например, одним из способов является «обратный мутагенез» одного или нескольких каркасных остатков до соответствующей зародышевой последовательности. Более конкретно, антитело, подвергшееся соматической мутации, может содержать каркасные остатки, отличающиеся от зародышевой последовательности, из которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать посредством сравнения каркасных последовательностей антитела с зародышевыми последовательностями, из которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасной области к их зародышевой конфигурации, можно проводить «обратный мутагенез» соматических мутаций до зародышевой последовательности, например, посредством сайт-специфического мутагенеза. Такие «подвергнутые обратному мутагенезу» антитела также предназначены для включения в изобретение.

[0141] Другой тип модификации каркасной области включает в себя мутагенез одного или нескольких остатков внутри каркасной области, или даже внутри одной или нескольких областей CDR, для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы таким образом уменьшать потенциальную иммуногенность антитела. Этот способ обозначен также как «деиммунизация» и более подробно описан в Публикации патента США No. 20030153043 от Carr *et al.*

[0142] Если присутствуют, константные области антител или фрагментов антител против GITR могут относиться к любому типу или подтипу, подходящим образом, и могут быть выбраны из вида субъекта, подлежащего лечению настоящими способами (например, человека, не относящегося к человеку примата или другого млекопитающего, например, сельскохозяйственного млекопитающего (например, лошадиного, овечьего, бычьего, свиного, верблюдового), домашнего млекопитающего (например, собачьего, кошачьего) или грызуна (например, крысы, мыши, хомяка, кролика).

В некоторых вариантах осуществления антитела против GITR конструируют для получения гуманизированных антител или антител Humaneered®. В некоторых вариантах осуществления, изотип константной области представляет собой IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. В конкретных вариантах осуществления изотип константной области представляет собой IgG₁.

[0143] Дополнительно или альтернативно к модификациям, выполненным внутри каркасных областей или областей CDR, антитела или фрагменты антител по изобретению можно конструировать для включения модификаций в область Fc, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание рецептора Fc и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Более того, антитело или фрагмент антитела по изобретению можно химически модифицировать (например, одну или несколько химических групп можно присоединять к антителу) или можно модифицировать для изменения его гликозилирования, снова для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела или фрагмента антитела.

[0144] В одном варианте осуществления, шарнирная область CH1 является модифицированной, так что количество остатков цистеина в шарнирной области изменено, например, увеличено или уменьшено. Этот способ дополнительно описан в Патенте США No. 5677425 от Bodmer *et al.* Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 можно изменять, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела или фрагмента антитела.

[0145] В другом варианте осуществления, шарнирную область Fc антитела подвергают мутагенезу для изменения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот вводят в поверхность контакта домена CH2-CH3 Fc-шарнирного фрагмента, так что антитело обладает нарушенным связыванием стафилококкового белка A (SpA) относительно связывания SpA нативным Fc-шарнирным доменом. Этот способ более подробно описан в Патенте США No. 6165745 от Ward *et al.*

[0146] В другом варианте осуществления, антитело модифицируют для увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные способы. Например, можно вводить одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в Патенте США No. 6277375 от Ward. Альтернативно, для увеличения биологического времени полужизни, антитело можно изменять внутри области CH1 или CL, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора спасения, полученный из двух петель домена CH2 области Fc IgG, как описано в Патентах США No. 5869046 и 6121022 от Presta *et al.*

[0147] В других вариантах осуществления, область Fc изменяют посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько аминокислот можно заменять на другой аминокислотный остаток, так чтобы антитело обладало измененной аффинностью для эффекторного лиганда, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность для которого изменяют, может представлять собой, например, рецептор Fc (FcR) или компонент комплемента C1. Этот способ более подробно описан в Патентах США No. 5624821 и 5648260, оба от Winter *et al.*

[0148] В другом варианте осуществления, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменять на другой аминокислотный остаток, так чтобы антитело обладало измененным связыванием C1q и/или уменьшенной или утраченной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Этот способ более подробно описан в Патенте США No. 6194551 от Idusogie *et al.*

[0149] Антитела, содержащие такие мутации, опосредуют уменьшенную или не опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные остатки L234 и L235 из константной области IgG1 заменены на Ala234 и Ala235. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный остаток N267 из константной области IgG1 заменен

на Ala267.

[0150] В другом варианте осуществления, один или несколько аминокислотных остатков изменяют, чтобы таким образом изменить способность антитела связывать комплемент. Этот способ дополнительно описан в публикации PCT WO 94/29351 от Bodmer *et al.*

[0151] В другом варианте осуществления, область Fc модифицируют для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела для рецептора Fcγ посредством модификации одной или нескольких аминокислот. Этот способ дополнительно описан в публикации PCT WO 00/42072 от Presta. Более того, картированы участки связывания на IgG1 человека для FcγR1, FcγR2, FcγR3 и FcRn, и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R.L. *et al.*, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

[0152] В другом варианте осуществления, гликозилирование антитела является модифицированным. Например, можно получать агликозилированное антитело (т.е., антитело, лишенное гликозилирования). Гликозилирование можно изменять, например, для увеличения аффинности антитела для «антигена». Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством изменения одного или нескольких участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществлять одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или нескольких участков гликозилирования из каркаса вариабельной области, чтобы таким образом исключить гликозилирование в этом участке. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела для антигена. Такой способ более подробно описан в Патентах США No. 5714350 и 6350861 от Co *et al.*

[0153] Дополнительно или альтернативно, можно получать антитело, обладающего измененным типом гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, обладающее уменьшенным количеством остатков фукозила, или антитело, обладающее

увеличенным количеством разделенных надвое структур GlcNac. Показано, что такие измененные паттерны гликозилирования увеличивают способность ADCC антител. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования описаны в данной области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев, в которых следует экспрессировать рекомбинантные антитела по изобретению, чтобы таким образом получать антитело с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 by Hang *et al.* описана линия клеток с функционально поврежденным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессированные в такой линии клеток, обладают гипофукозилированием. В публикации PCT WO 03/035835 от Presta описан вариант линии клеток CHO, клетки Lec13, с уменьшенной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этих клетках-хозяевах (см. также Shields, R.L. *et al.*, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 от Umana *et al.* описаны линии клеток, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в этих сконструированных клеточных линиях, обладают увеличенным количеством разделенных надвое структур GlcNac, что приводит к увеличенной активности ADCC этих антител (см. также Umana *et al.*, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Прививка антигенсвязывающих доменов в альтернативные каркасы или остовы

[0154] Можно использовать широкое множество каркасов или остовов антител/иммуноглобулинов, при условии, что полученный полипептид содержит по меньшей мере одну связывающую область, которая специфически связывается с GITR. Такие каркасы или остовы включают в себя 5 основных идиотипов иммуноглобулинов человека или их фрагменты, и включают в себя иммуноглобулины других видов животных, предпочтительно, обладающие

гуманизированными аспектами. Антитела из одиночной тяжелой цепи, такие как идентифицированные у верблюдовых, представляют особенный интерес в этом отношении. Специалисты в данной области продолжают открывать и разрабатывать новые каркасы, остовы и фрагменты.

[0155] В одном аспекте изобретение относится к получению антител на неиммуноглобулиновой основе с использованием не относящихся к иммуноглобулинам остовов, на которые можно прививать CDR по изобретению. Можно использовать известные или не обнаруженные до настоящего времени не относящиеся к иммуноглобулинам каркасы и остовы, при условии, что они содержат связывающую область, специфическую для белка-мишени GITR (например, GITR человека и/или яванского макака). Известные не относящиеся к иммуноглобулинам каркасы или остовы включают в себя, но без ограничения, фибронектин (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), анкирин (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), доменные антитела (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, и Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium), липокалин (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), иммунофармацевтические средства на основе модульных белков малого размера (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), максиантитела (Avidia, Inc., Mountain View, CA), белок А (Affibody AG, Sweden) и аффилин (гамма-кристаллин или убиквитин) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany).

[0156] Фибронектиновые остовы основаны на домене фибронектина типа III (например, десятом модуле фибронектина типа III (домене 10 Fn3)). Домен фибронектина типа III имеет 7 или 8 бета-цепей, которые распределены между двумя бета-складками, которые, в свою очередь, упакованы друг против друга с формированием сердцевины белка, и, кроме того, включают петли (аналогичные CDR), которые связывают бета-цепи друг с другом и экспонированы для воздействия растворителя. Существует по меньшей мере три таких петли на каждом краю сэндвича бета-складки, где край представляет собой границу белка, перпендикулярную направлению бета-цепей (см. US 6818418). Эти остовы на основе фибронектина не являются иммуноглобулином, хотя общая складка является близко родственной складке наименьшего

функционального фрагмента антитела, переменной области тяжелой цепи, которая включает полный элемент распознавания антигена в IgG верблюда и ламы. Вследствие этой структуры, неиммуноглобулиновое антитело имитирует свойства связывания антигена, сходные по природе и аффинности с этими свойствами антител. Эти остовы можно использовать в способе рандомизации и перетасовки петель *in vitro*, сходном с процессом аффинного созревания антител *in vivo*. Эти молекулы на основе фибронектина можно использовать в качестве остовов, где области петель молекулы можно заменять на CDR по изобретению с использованием стандартных способов клонирования.

[0157] Способ анкиринов основан на использовании белков с происходящими из анкирина модулями повторов в качестве остовов, чтобы нести переменные области, которые можно использовать для связывания различных мишеней. Модуль анкиринового повтора представляет собой полипептид из 33 аминокислот, состоящий из двух антипараллельных α -спиралей и β -поворота. Связывание переменных областей оптимизируют главным образом с использованием рибосомного дисплея.

[0158] Авимеры происходят из белка, содержащего природный А-домен, такого как LRP-1. Эти домены используются в природе для белок-белковых взаимодействий, и у человека более 250 белков структурно основаны на А-доменах. Авимеры состоят из ряда различных мономеров «А-домена» (2-10), связанных посредством аминокислотных линкеров. Можно получать авимеры, которые могут связывать антиген-мишень, с использованием способа, описанного, например, в Публикациях патентных заявок США No. 20040175756; 20050053973; 20050048512; и 20060008844.

[0159] Аффинные лиганды аффитела представляют собой небольшие, простые белки, состоящие из трехспирального пучка, основанные на остоле одного из связывающих IgG доменов белка А. Белок А представляет собой поверхностный белок из бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот домен остола состоит из 58 аминокислот, 13 из которых рандомизируют для получения библиотек аффител с большим количеством вариантов лиганда (См., например,

US 5831012). Молекулы аффител имитируют антитела, они обладают молекулярной массой 6 кДа, по сравнению с молекулярной массой антител, которая составляет 150 кДа. Несмотря на небольшой размер, связывающий участок молекул аффитела является сходным с участком антитела.

[0160] Антикалины представляют собой продукты, разработанные компанией Pieris ProteoLab AG. Они происходят из липокалинов, широко распространенной группы небольших и устойчивых белков, которые, как правило, вовлечены в физиологический транспорт или накопление химически чувствительных или нерастворимых соединений. Несколько природных липокалинов встречается в тканях или жидкостях организма человека. Структура белка напоминает иммуноглобулины, с гипервариабельными петлями в верхней части жесткого каркаса. Однако, в отличие от антител или их рекомбинантных фрагментов, липокалины состоят из одной полипептидной цепи со 160–180 аминокислотными остатками, являясь только незначительно большими, чем один домен иммуноглобулина. Группа из четырех петель, которая создает связывающий карман, обладает выраженной структурной пластичностью и допускает множество боковых цепей. Таким образом, форму связывающего участка можно изменять запатентованным способом для узнавания предназначенных молекул-мишеней различной формы с высокой аффинностью и специфичностью. Один из белков из семейства липокалинов, связывающий билин белок (BBP) из *Pieris Brassicae*, использовали для разработки антикалинов посредством мутагенеза группы из четырех петель. Одним из примеров патентных заявок, описывающих антикарины, является Публикация РСТ No. WO 199916873.

[0161] Молекулы аффилины представляют собой небольшие не относящиеся к иммуноглобулинам белки, которые разрабатывают для получения специфической аффинности по отношению к белкам и небольшим молекулам. Новые молекулы аффилины можно очень быстро отбирать из двух библиотек, каждая из которых основана на отличном остове человеческого белка. Молекулы аффилины не обладают никакой структурной гомологией с белками иммуноглобулинов. В настоящее время, используют два остова

аффилина, один из которых представляет собой гамма-кристаллин, структурный белок хрусталика глаза человека, а другой представляет собой белки из суперсемейства «убиквитина». Оба человеческих остова являются очень небольшими, обладают высокой термостабильностью и являются почти устойчивыми к изменениям pH и денатурирующим агентам. Эта высокая стабильность в основном обусловлена расширенной структурой бета-складки этих белков. Примеры происходящих из гамма-кристаллина белков описаны в WO200104144 и примеры «подобных убиквитину» белков описаны в WO2004106368.

[0162] Миметики белковых эпитопов (РЕМ) представляют собой циклические, пептидоподобные молекулы среднего размера (MW 1–2 кДа), имитирующие вторичные структуры бета-шпильки белков, основную вторичную структуру, вовлеченную в белок-белковые взаимодействия.

Человеческие или гуманизированные антитела

[0163] Настоящее изобретение относится к сконструированным человеческим антителам, специфически связывающим белок GITR (например, GITR человека). По сравнению с химерными, приматизированными или гуманизированными антителами, человеческие связывающие GITR антитела по изобретению обладают дополнительно уменьшенной антигенностью при введении субъектам-людям.

[0164] Человеческие связывающие GITR антитела можно получать с использованием способов, известных в данной области. Например, технологическую платформу Humaneered® (KaloBios, Sout San Francisco, CA) использовали для перевода не относящихся к человеку антител в сконструированные человеческие антитела. В Публикации патента США No. 20050008625 описан способ *in vivo* для замены не относящейся к человеку вариабельной области антитела на человеческую вариабельную область в антителе с сохранением в то же время таких же характеристик связывания или с обеспечением лучших характеристик связывания относительно характеристик не относящегося к человеку антитела. Способ основан на направляемой эпитопом замене вариабельных областей не относящегося к человеку

эталонного антитела на полностью человеческое антитело. Полученное человеческое антитело, как правило, не является структурно родственным эталонному не относящемуся к человеку антителу, однако, связывает тот же самый эпитоп на том же самом антигене, что и эталонное антитело.

[0165] Антитела против GITR по изобретению основаны на сконструированных человеческих антителах с последовательностями V-области, обладающими значительной идентичностью аминокислотной последовательности с человеческими зародышевыми последовательностями V-области, в то же время сохраняющими специфичность и аффинность эталонного антитела. См., Публикацию патента США No. 2005/0255552 и Публикацию патента США No. 2006/0134098, полное содержание обеих из которых, таким образом, приведено в настоящем документе в качестве ссылки. В способе улучшения идентифицируют информацию о минимальной последовательности, необходимой для определения специфичности связывания антигена, из варибельной области эталонного антитела, и переводят эту информацию в библиотеку частичных последовательностей человеческих генов V-области для получения сфокусированной на эпитопах библиотеки V-областей человеческого антитела. Систему секреции на основе микроорганизмов можно использовать для экспрессии членов библиотеки в форме фрагментов Fab антитела, и проводить скрининг библиотеки по антигенсвязывающим Fab, например, с использованием анализа связывания с отпечатком колоний. См., например, Публикацию патента США No. 2007/0020685. Положительные клоны можно подвергнуть дальнейшей характеристике для идентификации клонов с наивысшей аффинностью. Полученные сконструированные человеческие Fab сохраняют специфичность связывания исходного, эталонного антитела против GITR, как правило, обладают эквивалентной или более высокой аффинностью для антигена по сравнению с исходным антителом, и обладают V-областями с высокой степенью идентичности последовательности по сравнению с V-областями человеческого зародышевого антитела.

[0166] Минимальная детерминанта специфичности связывания (BSD), необходимая для получения сфокусированной на эпитопе

библиотеки, как правило, представлена последовательностью внутри CDR3 тяжелой цепи («CDRH3») и последовательностью внутри CDR3 легкой цепи («CDRL3»). BSD может содержать часть или полноразмерную CDR3. BSD может состоять из смежных или не смежных аминокислотных остатков. В некоторых случаях, сфокусированную на эпитопе библиотеку конструируют из человеческих последовательностей V-сегмента, связанных с уникальной областью CDR3-FR4 из эталонного антитела, содержащей последовательности BSD и человеческого зародышевого J-сегмента (см. Публикацию патента США No. 2005/0255552). Альтернативно, можно получать библиотеки человеческих V-сегментов посредством последовательной замены кассет, в которых только часть V-сегмента эталонного антитела первоначально заменена на библиотеку человеческих последовательностей. Идентифицированные человеческие «кассеты», поддерживающие связывание в контексте остальных аминокислотных последовательностей эталонного антитела, затем подвергают рекомбинации во втором скрининге библиотеки для получения полностью человеческих V-сегментов (см., Публикацию патента США No. 2006/0134098).

[0167] В каждом случае, спаренные сегменты CDR3 тяжелой и легкой цепи, сегменты CDR3-FR4 или J-сегменты, содержащие детерминанты специфичности из эталонного антитела, используют для ограничения специфичности связывания, так что связывающие антиген члены, полученные из библиотеки, сохраняют эпитопную специфичность эталонного антитела. Дополнительные изменения с целью созревания можно вводить в области CDR3 каждой цепи в ходе конструирования библиотеки для идентификации антител с оптимальной кинетикой связывания. Полученные сконструированные человеческие антитела обладают последовательностями V-сегмента, происходящими из человеческих зародышевых библиотек, сохраняют короткую последовательность BSD внутри областей CDR3 и обладают человеческими зародышевыми каркасными областями 4 (FR4).

Антитела верблюдовых

[0168] Белки антитела, полученные из членов семейства верблюда и дромадера (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), включая членов семейства из Нового Света, таких как виды лам

(например, *Lama paccos*, *Lama glama*, и *Lama vicugna*), охарактеризованы в отношении размера, структурной сложности и антигенности для субъектов-людей. В конкретных антителах IgG из этого семейства млекопитающих, как обнаружено в природе, отсутствуют легкие цепи, и они, таким образом, отличаются по структуре от типичной для антител из других животных четверичной структуры с четырьмя цепями, обладающей двумя тяжелыми и двумя легкими цепями. См. РСТ/ЕР93/02214 (WO 94/04678, опубликованную 3 марта 1994 г.).

[0169] Область антитела верблюдовых, представляющую собой небольшой одиночный переменный домен, обозначенную как VHH, можно получать посредством генной инженерии для получения небольшого белка, обладающего высокой аффинностью для мишени, с получением в результате происходящего из антитела белка с низкой молекулярной массой, известного как «наноантитело верблюдовых». См. Патент США номер 5759808, выданный 2 июня 1998 г.; см. также Stijlemans, B. et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; и Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Сконструированные библиотеки антител и фрагментов антител верблюдовых являются коммерчески доступными, например, из Ablynx, Ghent, Belgium. Как и для других антител не относящегося к человеку происхождения, аминокислотную последовательность антитела верблюдовых можно изменять рекомбинантным способом для получения последовательности, более близко сходной с человеческой последовательностью, т.е., наноантитело может являться «гуманизированным». Таким образом, природную низкую антигенность антител верблюдовых для человека можно дополнительно уменьшать.

[0170] Наноантитело верблюдовых обладает молекулярной массой приблизительно в одну десятую массы молекулы IgG человека, и белок обладает физическим диаметром только в несколько нанометров. Одним из следствий небольшого размера является способность наноантител верблюдовых связывать антигенные участки, которые являются функционально невидимыми

для более крупных белков антител, т.е., наноантитела верблюдовых можно использовать в качестве реагентов для детекции антигенов, которые в ином случае являются скрытыми, с использованием общепринятых иммунологических способов, и в качестве возможных лекарственных средств. Таким образом, другим следствием небольшого размера является то, что наноантитело верблюдовых может осуществлять ингибирование в результате связывания со специфическим участком в бороздке или узкой щели белка-мишени, и таким образом, может действовать с активностью, более близко сходной с функцией классического низкомолекулярного лекарственного средства, чем с функцией классического антитела.

[0171] Низкая молекулярная масса и компактный размер дополнительно приводят к тому, что наноантитела верблюдовых являются исключительно термостабильными, стабильными к экстремальному pH и к протеолитическому расщеплению, и слабо антигенными. Другим следствием является то, что наноантитела верблюдовых легко продвигаются из системы кровообращения в ткани, и даже пересекают гематоэнцефалический барьер и могут лечить нарушения, поражающие нервную ткань. Наноантитела могут дополнительно облегчать транспорт лекарственного средства через гематоэнцефалический барьер. См. Патентную заявку США 20040161738, опубликованную 19 августа 2004 г. Эти свойства в сочетании с низкой антигенностью для человека указывают на большой терапевтический потенциал. Кроме того, эти молекулы можно экспрессировать в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, и их экспрессируют в форме слитых белков с помощью бактериофагов, и они являются функциональными.

[0172] Соответственно, признаком настоящего изобретения является антитело или наноантитело верблюдовых, обладающее высокой аффинностью для GITR. В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе, антитело или наноантитело верблюдовых продуцировано естественным образом в верблюдовом животном, т.е., продуцировано верблюдовым после иммунизации GITR или его пептидным фрагментом, с использованием способов, описанных в настоящем документе для других антител. Альтернативно связывающее GITR наноантитело верблюдовых является

сконструированным, т.е., полученным посредством отбора, например, из библиотеки экспонированных на фагах подвергнутых подходящему мутагенезу белков наноантител верблюдовых с использованием способов пэннинга с помощью GITR в качестве мишени, как описано в примерах в настоящем документе. Сконструированные наноантитела можно дополнительно модифицировать по заказу посредством генетической инженерии для получения времени полужизни у субъекта-реципиента от 45 минут до двух недель. В конкретном варианте осуществления, антитело или наноантитело верблюдовых получают посредством прививки последовательностей CDR тяжелой или легкой цепи человеческих антител по изобретению в каркасные последовательности нанотела или однодоменного антитела, как описано, например, в РСТ/ЕР93/02214. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к мультивалентному антителу или наноантителу верблюдовых, в соответствии со способами, описанными ниже.

Мультивалентные антитела

[0173] В другом аспекте представлены мультивалентные молекулы (моноспецифические, биспецифические или мультиспецифические), содержащие связывающее GITR антитело или ее фрагмент, по изобретению. Антитело по изобретению или его антигенсвязывающие области можно дериватизировать или присоединять к другой функциональной молекуле, например, другому пептиду или белку (например, к другому антителу или лиганду для рецептора) для получения мультивалентной молекулы, связывающей по меньшей мере два различных участка связывания (которые могут представлять собой одинаковые или различные участки-мишени или молекулы-мишени). В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению дериватизируют или функционально связывают (например, посредством химического присоединения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или другим способом) с более, чем одной отличной функциональной молекулой для получения мультивалентной молекулы, связывающей по меньшей мере два различных участка связывания, представляющие собой одинаковые или различные участки связывания на одной и той же молекуле-

мишени. В конкретных вариантах осуществления, участки мультивалентного связывания являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению дериватизируют или связывают с более, чем одной отличной функциональной молекулой для получения мультиспецифических молекул, связывающих два или более различных участка связывания по меньшей мере на двух молекулах-мишенях; такие мультиспецифические молекулы также предназначены для включения в термин «биспецифическая молекула» или «мультиспецифическая молекула», как применяют в настоящем документе. Для получения биспецифической молекулы по изобретению, антитело по изобретению можно функционально связывать (например, посредством химического присоединения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или другим способом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептидный миметик или миметик связывания, с получением в результате мультивалентной молекулы. Настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, обладающим по меньшей мере одной первой специфичностью связывания для GITR и второй специфичностью связывания для второго эпитопа-мишени. Например, второй эпитоп-мишень представляет собой другой эпитоп из GITR, отличный от первого эпитопа-мишени. Кроме того, в случае изобретения, в котором молекула является мультиспецифической, в некоторых вариантах осуществления молекула дополнительно включает в себя третью специфичность связывания, в дополнение к первому и второму эпитопам-мишеням.

[0174] В одном варианте осуществления, биспецифические молекулы по изобретению содержат, в качестве специфичности связывания, по меньшей мере одно антитело, или фрагмент антитела, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечное Fv. Антитело может также представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи, или любой его минимальный фрагмент, такой как конструкция Fv или одноцепочечная конструкция, как описано в Ladner *et al.* Патент США No. 4946778.

[0175] Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифические молекулы, в которых домены VH и VL

экспрессированы на одной полипептидной цепи, соединенные линкером, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи. Домены VH и VL спариваются с комплементарными доменами другой цепи, таким образом, создавая два антигенсвязывающих участка (см., например, Holliger *et al.*, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak *et al.*, 1994 *Structure* 2:1121-1123). Диатела можно получать посредством экспрессии двух полипептидных цепей со структурой либо VHA-VLB и VHB-VLA (конфигурация VH-VL), либо VLA-VHB и VLB-VHA (конфигурация VL-VH) в одной и той же клетке. Большинство из них можно экспрессировать в растворимой форме в бактериях. Одноцепочечные диатела (scDb) получают посредством соединения двух образующих диатело полипептидных цепей с линкером из приблизительно 15 аминокислотных остатков (см. Holliger and Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(3-4):128-30; Wu *et al.*, 1996 *Immunotechnology*, 2(1):21-36). scDb можно экспрессировать в бактериях в растворимой, активной мономерной форме (см. Holliger and Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(34): 128-30; Wu *et al.*, 1996 *Immunotechnology*, 2(1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997 *Immunotechnology*, 3(2): 83-105; Ridgway *et al.*, 1996 *Protein Eng.*, 9(7):617-21). Диатело можно сливать с Fc для получения «ди-диател» (см. Lu *et al.*, 2004 *J. Biol. Chem.*, 279(4):2856-65).

[0176] Другие антитела, которые можно использовать в биспецифических молекулах по изобретению, представляют собой мышиные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

[0177] Биспецифические и/или мультивалентные молекулы по настоящему изобретению можно получать посредством конъюгации составляющих специфичностей связывания, с использованием способов, известных в данной области. Например, каждую специфичность связывания из биспецифической и/или мультивалентной молекулы можно получать по отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Когда специфичности связывания представляют собой белки или пептиды, множество средств для присоединения или перекрестного сшивания можно использовать для ковалентной конъюгации. Примеры средств для перекрестного

сшивания включают в себя белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеинимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky *et al.*, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *et al.*, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие способы включают в себя способы, описанные в Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan *et al.*, 1985 Science 229:81-83), и Glennie *et al.*, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Средства для конъюгации представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба доступные из Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

[0178] Когда специфичности связывания представляют собой антитела, их можно конъюгировать посредством сульфгидрильного связывания шарнирных областей константных доменов двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления, шарнирную область модифицируют для содержания нечетного количества сульфгидрильных остатков, например, одного, перед конъюгацией.

[0179] Альтернативно, специфичности связывания можно кодировать в одном и том же векторе и экспрессировать и собирать в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ является особенно полезным, когда биспецифическая и/или мультивалентная молекула представляет собой слитый белок mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ или лиганд x Fab. Биспецифическая и/или мультивалентная молекула по изобретению может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две связывающих детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в Патенте США номер 5260203; Патенте США номер 5455030; Патенте США номер 4881175; Патенте США номер 5132405; Патенте США номер 5091513; Патенте США номер 5476786; Патенте США номер 5013653; Патенте США номер 5258498; и Патенте США номер 5482858.

[0180] Связывание биспецифических и/или мультивалентных

молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать, например, посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунного анализа (REA), анализа FACS, биологического анализа (например, ингибирования роста) или анализа Вестерн-блоттингом. В каждом из этих анализов, как правило, детектируют присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особенный интерес, посредством использования меченного реагента (например, антитела), специфического для представляющего интерес комплекса.

Антитела с увеличенным временем полужизни

[0181] Настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител, специфически связывающим белок GITR, обладающим увеличенным временем полужизни *in vivo*.

[0182] Множество факторов может влиять на время полужизни белка *in vivo*. Например, фильтрация в почках, метаболизм в печени, деградация посредством протеолитических ферментов (протеаз) и иммуногенные ответы (например, нейтрализация белка посредством антител и поглощение макрофагами и дендритными клетками). Множество способов можно использовать для продления времени полужизни антител по настоящему изобретению. Например, посредством химического связывания с полиэтиленгликолем (ПЭГ), reCODE ПЭГ, остовом антитела, полисиаловой кислотой (PSA), гидроксипЭтилкрахмалом (ГЭК), альбуминсвязывающими лигандами и углеводными оболочками; посредством генетического слияния с белками, связывающимися с сывороточными белками, такими как альбумин, IgG, FcRn и трансферрин; посредством соединения (генетически или химически) с другими связывающими группами, которые связываются с сывороточными белками, такими как наноантитела, Fab, белки DARPIn, авимеры, аффитела и антикарины; посредством генетического слияния с rПЭГ, альбумином, доменом альбумина, альбуминсвязывающими белками и Fc; или посредством включения в наноносители, составы с замедленным высвобождением или медицинские устройства.

[0183] Для продления времени циркуляции антител в сыворотке *in vivo*, инертные полимерные молекулы, такие как высокомолекулярный ПЭГ, можно присоединять к антителам или их

фрагментам в присутствии или в отсутствие мультифункционального линкера, либо посредством сайт-специфической конъюгации ПЭГ с N- или C-концом антител, либо посредством эпсилон-аминогрупп, присутствующих на остатках лизина. Для пэгилирования антитела, как правило, проводят реакцию антитела или его фрагмента с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Пэгилирование можно осуществлять посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или с аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Как применяют в настоящем документе, термин «полиэтиленгликоль» предназначен, чтобы включать в себя любую из форм ПЭГ, которую используют для дериватизации других белков, таких как моно(C1-C10)алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеинимид. В конкретных вариантах осуществления, антитело, подлежащее пэгилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Используют дериватизацию линейным или разветвленным полимером, приводящую к минимальной потере биологической активности. Степень конъюгации можно тщательно мониторировать посредством SDS-PAGE и масс-спектрометрии для обеспечения надлежащей конъюгации молекул ПЭГ с антителами. Не вступивший в реакцию ПЭГ можно отделять от конъюгатов антитело-ПЭГ посредством эксклюзионной или посредством ионообменной хроматографии. Дериватизированные посредством ПЭГ антитела можно тестировать по активности связывания, так же как по эффективности *in vivo* efficacy с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области, например, посредством иммуноанализов, описанных в настоящем документе. Способы пэгилирования белков известны в данной области, и их можно применять для антител по изобретению. См., например, EP 0 154 316 от Nishimura *et al.* и EP 0 401 384 от Ishikawa *et al.*

[0184] Другие модифицированные способы пэгилирования включают в себя реконструированный способ направляемого вне зависимости от химического состава конструирования (ReCODE ПЭГ),

включающий в себя включение химически определенных боковых цепей в биосинтетические белки посредством реконструированной системы, включающей в себя тРНК-синтетазу и тРНК. Этот способ позволяет включение более 30 новых аминокислот в биосинтетические белки в клетках *E.coli*, дрожжи и млекопитающих. тРНК включает неприродную аминокислоту в любое место, где расположен янтарный кодон, превращая янтарный кодон из стоп-кодона в кодон, подающий сигнал включения химически определенной аминокислоты.

[0185] Рекомбинантный способ пэгилирования (pПЭГ) также можно использовать для продления времени полужизни в сыворотке. Этот способ включает в себя генетическое слияние неструктурированного белкового хвоста из 300–600 аминокислот с существующим фармацевтическим белком. Поскольку кажущаяся молекулярная масса такой неструктурированной белковой цепи приблизительно в 15 раз превышает ее фактическую молекулярную массу, время полужизни белка в сыворотке намного увеличивается. В отличие от общепринятого пэгилирования, требующего химической конъюгации и повторной очистки, процесс изготовления намного упрощается и продукт является гомогенным.

[0186] Полисиалирование представляет собой другой способ, в котором используют природный полимер полисиаловую кислоту (PSA) для продления времени активности и улучшения стабильности терапевтических пептидов и белков. PSA представляет собой полимер сиаловой кислоты (сахар). При использовании для доставки лекарственного средства на основе белка и терапевтического пептида, полисиаловая кислота обеспечивает защитное микроокружение при конъюгации. Это увеличивает время активности терапевтического белка в кровотоке и предотвращает его узнавание иммунной системой. Полимер PSA обнаружен в природе в организме человека. За миллионы лет эволюции его заимствовали определенные бактерии для покрытия своей клеточной стенки. Затем эти естественным образом полисиалированные бактерии приобрели способность, посредством молекулярной мимикрии, скрываться от системы защиты организма. PSA, по природной технологии малой заметности, можно получать из таких бактерий в больших количествах и с predetermined физическими характеристиками.

Бактериальная PSA является совершенно неиммуногенной, даже при присоединении к белкам, поскольку является химически идентичной PSA в организме человека.

[0187] Другой способ включает в себя использование производных гидроксиэтилкрахмала («ГЭК»), связанных с антителами. ГЭК представляет собой модифицированный природный полимер, который происходит из крахмала из восковой кукурузы и может подвергаться метаболизму посредством ферментов организма. Растворы ГЭК, как правило, вводят для замещения недостатка объема крови и для улучшения реологических свойств крови. Гэкилирование антитела позволяет продление времени полужизни в кровотоке посредством увеличения стабильности молекулы, так же как посредством уменьшения почечного клиренса, что приводит к увеличенной биологической активности. Посредством изменения различных параметров, таких как молекулярная масса ГЭК, можно получать широкий диапазон конъюгатов ГЭК-антитело по индивидуальному заказу.

[0188] Антитела, обладающие увеличенным временем полужизни *in vivo*, можно также получать посредством введения одной или нескольких модификаций аминокислот (т.е., замен, вставок или делеций) в константный домен IgG, или в его связывающий FcRn фрагмент (предпочтительно, фрагмент Fc или фрагмент шарнирного домена Fc). См., например, Международную публикацию No. WO 98/23289; Международную публикацию No. WO 97/34631; и Патент США No. 6277375.

[0189] Кроме того, антитела можно конъюгировать с альбумином для получения антитела или фрагмента антитела, которые являются более стабильными *in vivo* или обладают более длительным временем полужизни *in vivo*. Эти способы хорошо известны в данной области, см., например, Международные публикации No. WO 93/15199, WO 93/15200 и WO 01/77137; и Европейский патент No. EP 413622.

[0190] Способы увеличения времени полужизни являются особенно полезными для наноантител, связывающих средств на основе фибронектина и других антител или белков, для которых увеличенное время полужизни *in vivo* является желательным.

Конъюгаты антител

[0191] Настоящее изобретение относится к антителам или их фрагментам, специфически связывающимся с белком GITR, слитым рекомбинантным способом или химически конъюгированным (включая как ковалентную, так и нековалентную конъюгацию) с гетерологичным белком или полипептидом (или с его фрагментом, предпочтительно, с полипептидом из по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот) для получения слитых белков. В частности, изобретение относится к слитым белкам, содержащим антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанного в настоящем документе (например, фрагмент Fab, фрагмент Fd, фрагмент Fv, фрагмент F(ab)₂, домен VH, CDR VH, домен VL или CDR VL), и гетерологичный белок, полипептид или пептид. Способы слияния или конъюгации белков, полипептидов или пептидов с антителом или фрагментом антитела известны в данной области. См., например, Патенты США No. 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851, и 5112946; Европейские патенты No. EP 307434 и EP 367166; Международные публикации No. WO 96/04388 и WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; и Vil *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337- 11341.

[0192] Дополнительные слитые белки можно получать посредством способов перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (вместе обозначенными как «перетасовка ДНК»). Перетасовку ДНК можно использовать для изменения активности антител по изобретению или их фрагментов (например, антитела или их фрагменты с более высокой аффинностью и более низкой скоростью диссоциации). См., в общем, Патенты США No. 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten *et al.*, 1997, *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson, *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, 1998, *Biotechniques* 24(2):308-313 (полное содержание каждого из этих

патентов и публикаций, таким образом, приведено в качестве ссылки). Антитела или их фрагменты, или кодированные антитела или их фрагменты, можно изменять посредством подвергания случайному мутагенезу посредством ПЦР с пониженной точностью, вставки случайных нуклеотидов или других способов, до рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, специфически связывающие белок GITR, можно подвергать рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, секциями, частями, доменами, фрагментами и т.д. одной или нескольких гетерологичных молекул.

[0193] Кроме того, антитела или их фрагменты можно сливать с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. В предпочтительных вариантах осуществления, маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистидиновый (NNNNNN SEQ ID NO:11) пептид, такой как метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), среди прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано, например, в *Gentz et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 гексагистидин (SEQ ID NO:11) обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, которые можно использовать для очистки, включают в себя, но без ограничения, гемагглютининовую («НА») метку, соответствующую эпитопу, полученному из белка гемагглютинаина вируса гриппа (*Wilson et al.*, 1984, *Cell* 37:767), и метку «flag».

[0194] В других вариантах осуществления, антитела по настоящему изобретению или их фрагменты конъюгируют с диагностическим или поддающимся детекции средством. Такие антитела можно использовать для мониторингования или прогнозирования начала, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания или нарушения в качестве части способа клинического тестирования, такого как определение эффективности конкретного способа терапии. Такую диагностику и детекцию можно осуществлять посредством присоединения антитела к поддающимся детекции веществам, включая, но без ограничения, различные ферменты, такие как, но без ограничения, пероксидаза хрена, щелочная

фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как, но без ограничения, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как, но без ограничения, умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, но без ограничения, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, но без ограничения, люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как, но без ограничения, иод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I и ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn и ^{117}Sn ; и позитронно-активные металлы, используемые в различных позитронно-эмиссионных томографах, и ионы нерадиоактивного парамагнитного металла.

[0195] Настоящее изобретение, кроме того, относится к антителу или его фрагменту, конъюгированному с терапевтической группой или группой лекарственного средства, модифицирующим данный биологический эффект или ответ, и к применениям антител или их фрагментов, конъюгированных с терапевтической группой. Терапевтические группы или группы лекарственного средства не следует рассматривать как ограниченные классическими химическими лекарственными средствами. Например, группа лекарственного средства может представлять собой белок, пептид или полипептид, обладающий желательной биологической активностью. Такие белки могут включать в себя, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *pseudomonas*, холерный токсин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухолей, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста, тканевой активатор плазминогена, апоптотическое средство, антиангиогенное средство; или модификатор биологического ответа

например, такой как лимфокин. Антитело или его фрагмент можно конъюгировать с терапевтической группой, такой как цитотоксин, например, цитостатическое или уничтожающее клетки средство, лекарственное средство или ион радиоактивного металла, например, источники альфа-излучения. Цитотоксин или цитотоксическое средство включает в себя любое средство, оказывающее неблагоприятное воздействие на клетки.

[0196] Например, антитело можно конъюгировать с терапевтическими группами, такими как ион радиоактивного металла, такой как источники альфа-излучения, такие как ^{213}Bi или макроциклические хелаторы, которые можно использовать для конъюгации иона радиоактивного металла, включая, но без ограничения, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , с полипептидами. В конкретных вариантах осуществления, макроциклический хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -тетрауксусную кислоту (DOTA), которую можно присоединять к антителу посредством линкерной молекулы. Такие линкерные молекулы включают в себя, например, глициновые линкеры, например, GGGGS (SEQ ID NO:15), которые, необязательно, могут повторяться, например, GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:18), или другие линкеры являющиеся общеизвестными в данной области и описанные в Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; и Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, полное содержание каждого из которых приведено в качестве ссылки.

[0197] Способы конъюгации терапевтических групп с антителами хорошо известны, см., например, Arnon *et al.*, «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, «Antibodies For Drug Delivery», in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.*

(eds.), pp. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

[0198] Антитела можно также присоединять к твердым подложкам, которые являются особенно полезными для иммуноанализов или очистки антигена-мишени. Такие твердые подложки включают в себя, но без ограничения, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Полинуклеотиды, кодирующие агонистические антитела против GITR

[0199] Антитела, антигенсвязывающие молекулы против GITR и их фрагменты можно получать любыми способами, известными в данной области, включая, но без ограничения, рекомбинантную экспрессию, химический синтез и ферментативное расщепление тетрамеров антитела, в то время как полноразмерные моноклональные антитела можно получать, например, посредством гибридом или рекомбинантной продукции. Рекомбинантную экспрессию можно получать в любых пригодных клетках-хозяевах, известных в данной области, например, клетках-хозяевах млекопитающих, клетках-хозяевах бактерий, клетках-хозяевах дрожжей, клетках-хозяевах насекомых и т.д.

[0200] Изобретение, кроме того, относится к полинуклеотидам, кодирующим антитела, описанные в настоящем документе, например, полинуклеотидам, кодирующим переменные области или сегменты тяжелых или легких цепей, содержащие определяющие комплементарность области, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи, содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID

NO:101 и SEQ ID NO:107. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи, содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:102.

[0201] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:67. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:68.

[0202] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:72. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из SEQ ID NO:73.

[0203] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:74. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:68.

[0204] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид,

кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:68.

[0205] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:78. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:68.

[0206] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:103. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:104.

[0207] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:108. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:104.

[0208] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:60. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, обладает по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом из SEQ ID NO:58.

[0209] Полинуклеотиды по изобретению могут кодировать только последовательность вариабельной области антитела против GITR. Они могут также кодировать как вариабельную область, так и константную область антитела. Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют полипептид, содержащий вариабельные области как тяжелой цепи, так и легкой цепи одного из иллюстративных антител мыши против GITR. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два полипептидных сегмента, которые, соответственно, являются в основном идентичными вариабельным областям тяжелой цепи и легкой цепи одного из антител мыши.

[0210] Полинуклеотидные последовательности можно получать посредством твердофазного синтеза ДНК *de novo* или посредством ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, как описано в настоящем документе), кодирующей антитело против GITR или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять способами, известными в данной области, такими как фосфотриэфирный способ Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979; фосфодиэфирный способ Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979; диэтилфосфорамидитный способ Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981; и способ на твердой подложке из Патента США No. 4458066. Введение мутаций в полинуклеотидную последовательность посредством ПЦР можно проводить, как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al.,

Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; и Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[0211] Изобретение относится также к экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для продукции антител против GITR, описанных выше. Различные экспрессирующие векторы можно использовать для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи, фрагменты или связывающие фрагменты антител против GITR. Как основанные на вирусах, так и невирусные экспрессирующие векторы можно использовать для продукции антител в клетке-хозяине млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают в себя плазмиды, эписомные векторы, как правило, с экспрессирующей кассетой для экспрессии белка или РНК, и человеческие искусственные хромосомы (см., например, Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, пригодные для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов против GITR в клетках млекопитающих (например, человека), включают в себя векторы pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, San Diego, CA), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные в данной области для экспрессии других белков. Вирусные векторы, которые можно использовать, включают в себя векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса осповакцины и вируса леса Семлики (SFV). См., Brent et al., выше; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992.

[0212] Выбор экспрессирующего вектора зависит от намеченных клеток-хозяев, в которых вектор следует экспрессировать. Как правило, экспрессирующие векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), функционально связанные с полинуклеотидами, кодирующими цепь или фрагмент антитела против GITR. В некоторых вариантах осуществления, используют индуцибельный промотор для предотвращения экспрессии вставленных последовательностей в любых условиях, за исключением индуцирующих. Индуцибельные промоторы включают в себя, например, промотор арабинозы, lacZ,

промотор металлотioneина или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножать в условиях отсутствия индукции без сдвига популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносимы клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, другие регуляторные элементы могут также являться необходимыми или желательными для эффективной экспрессии цепи или фрагмента антитела против GITR. Эти элементы, как правило, включают иницирующий кодон ATG и соседний участок связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно улучшать посредством включения энхансеров, подходящих для используемых клеточных систем (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, энхансер SV40 или энхансер CMV можно использовать для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

[0213] Экспрессирующие векторы могут также предоставлять сигнальную последовательность для секреции, расположенную для формирования слитого белка с полипептидами, кодируемыми вставленными последовательностями антитела против GITR. Более часто, вставленные последовательности антитела против GITR присоединяют к сигнальным последовательностям перед включением в вектор. Векторы для использования для получения последовательностей, кодирующих переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела против GITR, иногда кодируют также константные области или их части. Такие векторы позволяют экспрессию переменных областей в форме слитых белков с константными областями, таким образом, приводя к продукции интактных антител или их фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

[0214] Клетки-хозяева для переноса и экспрессии цепей антител против GITR могут являться либо прокариотическими, либо эукариотическими. *E. coli* представляет собой одного из прокариотических хозяев, которого можно использовать для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микроорганизмы-хозяева, пригодные для

использования, включают в себя бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах можно также получать экспрессирующие векторы, которые, как правило, содержат последовательности для контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку начала репликации). Кроме того, может присутствовать любое количество из множества хорошо известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система из фага лямбда. Промоторы, как правило, контролируют экспрессию, необязательно, с помощью последовательности оператора, и обладают последовательностями участка связывания рибосомы и т.п., для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также можно использовать для экспрессии полипептидов против GITR по изобретению. Можно также использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

[0215] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, клетки-хозяева млекопитающих используют для экспрессии и продукции полипептидов против GITR по настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой либо линию клеток гибридомы, экспрессирующих эндогенные гены иммуноглобулинов (например, клоны гибридомы миеломы, как описано в примерах), либо линию клеток млекопитающих, несущих экзогенный экспрессирующий вектор (например, клетки миеломы SP2/0, проиллюстрированные ниже). Они включают в себя любые нормальные смертные или нормальные или аномальные immortalized клетки животных или человека. Например, разработан ряд пригодных линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии клеток CHO, различные линии клеток Cos, клетки HeLa, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов обсуждают в общем, например, в Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессирующие векторы для

клеток-хозяев млекопитающих могут включать в себя последовательности для контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), и необходимые информационные участки для процессинга, такие как участки связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиаденилирования, и последовательности терминации транскрипции. Эти экспрессирующие векторы обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Пригодные промоторы могут являться конститутивными, специфическими для типа клеток, специфическими для стадии, и/или модулируемыми или регулируемыми. Промоторы, которые можно использовать, включают в себя, но без ограничения, промотор металлотioneина, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP polIII, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как немедленно-ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области.

[0216] Способы введения экспрессирующих векторов, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, меняют в зависимости от типа клеточного хозяина. Например, трансфекцию с помощью хлорида кальция обычно используют для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеточных хозяев (см. в общем Sambrook et al., выше). Другие способы включают в себя, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, использование виросом, иммунолипосом, конъюгатов поликатион: нуклеиновая кислота, голой ДНК, искусственных вирионов, слияние со структурным белком вируса герпеса VP22 (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленное агентом поглощение ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для длительной продукции рекомбинантных белков с высоким выходом, стабильная экспрессия часто является желательной. Например, линии клеток, стабильно экспрессирующих

цепи или связывающие фрагменты антитела против GITR, можно получать с использованием экспрессирующих векторов по изобретению, содержащих вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективного маркера. После введения вектора клеткам можно давать возможность расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде перед тем, как их переведут на селективную среду. Целью селективного маркера является придание устойчивости к отбору, и его присутствие обеспечивает рост клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности, в селективных средах. Можно обеспечивать пролиферацию устойчивых стабильно трансфицированных клеток с использованием способов культивирования клеток, подходящих для типа клеток.

Анализы для идентификации агонистических антител против GITR

[0217] Анализы для идентификации агонистических антител против GITR известны в данной области и описаны в настоящем документе. Агонистические антитела против GITR связываются с GITR и активируют, индуцируют, стимулируют внутриклеточную передачу сигналов посредством GITR.

[0218] Связывание антител против GITR с GITR можно определять с использованием любого способа, известного в данной области. Например, связывание с GITR можно определять с использованием известных способов, включая, без ограничения, ELISA, Вестерн-блоттинг, поверхностный плазмонный резонанс (например, BIAcore) и проточную цитометрию.

[0219] Внутриклеточную передачу сигнала посредством GITR можно измерять с использованием любого способа, известного в данной области. Например, активация посредством GITR стимулирует передачу сигнала посредством NF κ B и MAPK. Способы измерения активации NF κ B и MAPK являются стандартными в данной области (например, использование анализов репортерных генов, ядерной транслокации белков посредством NF κ B, статуса фосфорилирования белков MAPK). Активация посредством GITR представляет собой костимулирующий сигнал, усиливающий пролиферацию активированных

CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в присутствии активации посредством Т-клеточного рецептора (например, в присутствии первичного антигена или антигена-мишени). Способы измерения пролиферации клеток являются стандартными в данной области (например, анализы включения ³H-тимидина, мечение CFSE). Передача сигнала посредством GITR также костимулирует активированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки в присутствии активации посредством Т-клеточного рецептора для продукции цитокинов. Передача сигнала посредством GITR также костимулирует активированные клетки NK для продукции цитокинов. Цитокины могут относиться к любому типу или к обоим типам из цитокинов Th1-типа (например, интерферон-γ, IL-2 и TNF) и цитокинов Th2-типа (например, IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13). Способы измерения продукции цитокинов хорошо известны в данной области (например, анализы ELISA, анализы ELISpot). Активация посредством GITR может также индуцировать апоптоз. Способы измерения апоптоза клеток являются стандартными в данной области (например, окрашивание аннексина V). При проведении анализов *in vitro*, тестируемые клетки или культуральный супернатант из тестируемых клеток после контакта с агонистическими антителами против GITR можно сравнивать с контрольными клетками или культуральными супернатантами из контрольных клеток, которые не приводили в контакт с агонистическими антителами против GITR.

[0220] Функциональные свойства агонистов GITR у антител по настоящему изобретению также можно измерять *in vivo*. Предпочтительные агонистические антитела против GITR обладают способностью к активации и увеличению количества CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Активацию и увеличение количества CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток *in vivo* можно измерять с использованием любого способа, известного в данной области, например, посредством проточной цитометрии. Предпочтительные агонистические антитела против GITR могут являться терапевтически полезными для ингибирования роста опухолей или стимуляции уменьшения размеров опухолей. Рост опухоли, или его ингибирование, можно измерять с использованием любого способа, известного в данной области (например, визуального обследования, штангенциркуля, определения массы,

способов визуализации, включая ЯМР). Предпочтительные агонистические антитела против GITR могут являться терапевтически полезными для предотвращения, уменьшения, ингибирования или уничтожения этиологического фактора инфекционного заболевания, например, бактериальной, грибковой, вирусной или паразитической инфекции. Эффективность агонистических антител против GITR для усиления ответа Т-клеток или уменьшения тяжести заболевания можно определять посредством введения терапевтически эффективного количества антитела субъекту и сравнения субъекта до и после введения антитела. Эффективность агонистических антител против GITR для усиления Т-клеточного ответа или уменьшения тяжести заболевания также можно определять посредством введения терапевтически эффективного количества антитела тестируемому субъекту и сравнения тестируемого субъекта с контрольным субъектом, которому не вводили антитело.

Композиции, содержащие агонистические антитела против GITR

[0221] Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR по настоящему изобретению, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Необязательно, фармацевтические композиции, кроме того, содержат одно или несколько других лекарственных средств (средства), пригодных для лечения или предотвращения данного нарушения. Фармацевтически приемлемые носители улучшают или стабилизируют композицию, или облегчают получение композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми.

[0222] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить множеством способов, известных в данной области. Путь и/или способ введения меняют в зависимости от желательных результатов. Предпочтительно, чтобы введение являлось внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным, или представляло собой введение поблизости от

участка-мишени. Фармацевтически приемлемый носитель должен являться пригодным для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, интраназального, ингаляционного, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения, активное соединение, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или мультивалентную молекулу по изобретению (например, моноспецифическую, биспецифическую или мультиспецифическую молекулу), можно покрывать материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

[0223] Антитело или его фрагмент, отдельно или в комбинации с другими пригодными компонентами, можно получать в форме аэрозольных составов (т.е., их можно «распылять») для введения посредством ингаляции. Аэрозольные составы можно помещать в пригодные сжатые пропелленты, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п.

[0224] В некоторых вариантах осуществления, композиция является стерильной и жидкой. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытий, таких как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях, является предпочтительным включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия. Длительную абсорбцию пригодных для инъекции композиций можно осуществлять посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина. В конкретных вариантах осуществления композиции можно получать для хранения в лиофилизированной форме с использованием пригодных наполнителей (например, сахарозы)

[0225] Фармацевтические композиции по изобретению можно получать в соответствии со способами, хорошо известными и общеупотребительными в данной области. Фармацевтически приемлемые носители частично определяются конкретной вводимой композицией, так же как конкретным способом, используемым для

введения композиции. Соответственно, существует широкое множество пригодных составов фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Пригодные способы для получения составов антител и определения подходящих дозировки и расписания можно найти, например, в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippincott Williams & Wilkins (2005); и в *Martindale: The Complete Drug Reference*, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press., и в *Martindale, Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 31st Edition., 1996, Amer Pharmaceutical Assn, и в *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, содержание каждого из которых, таким образом, приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в условиях GMP. Как правило, терапевтически эффективную дозу или эффективную дозу антитела против GITR применяют в фармацевтических композициях по изобретению. Антитела против GITR составляют в фармацевтически приемлемые лекарственные формы посредством общепринятых способов, известных специалистам в данной области. Режимы дозирования корректируют для обеспечения желательного ответа (например, терапевтического ответа). При определении терапевтически или профилактически эффективной дозы, можно вводить низкую дозу, и затем постепенно увеличивать до достижения желательного ответа с минимальными нежелательными побочными эффектами или без нежелательных побочных эффектов. Например, можно вводить однократный болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени, или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как показано по необходимости в этой терапевтической ситуации. Является особенно предпочтительным формулировать композиции для парентерального введения в единичной дозированной форме для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная дозированная форма, как применяют в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения,

рассчитанное для оказания желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

[0226] Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять для получения количества активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозирования зависит от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретной используемой композиции по настоящему изобретению, или ее эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующий анамнез пациента, подвергаемого лечению, и подобные факторы.

Получение совместного состава с вторым средством

[0227] В некоторых вариантах осуществления, фармакологические композиции содержат смесь антитела или антигенсвязывающей молекулы против GITR и второго фармакологического средства. Иллюстративные вторые средства для включения в смеси с агонистическим антителом или антигенсвязывающей молекулой против GITR по настоящему изобретению включают в себя, без ограничения, первичные антигены или антигены-мишени, средства, увеличивающие иммуногенность клеток опухоли, средства, ингибирующие или супрессирующие коингибирующие сигналы.

[0228] Антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR по изобретению можно составлять совместно (т.е., предоставлять в форме смеси или получать в смеси) с первичным антигеном или антигеном-мишенью. Антиген-мишень, или вакцина, зависит от состояния заболевания, подлежащего лечению. Например, антиген-мишень может происходить из клетки опухоли, клетки бактерии, гриба, вируса или паразита. Антиген-мишень может присутствовать в форме пептида, полипептида, клетки или полинуклеотида, по

необходимости.

[0229] В одном варианте осуществления, антиген-мишень происходит из вируса, например, выбранного из группы, состоящей из: вируса гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа, ветряной оспы, аденовируса, вируса простого герпеса типа I (HSV I), вируса простого герпеса типа II (HSV II), вируса чумы крупного рогатого скота, риновируса, эховируса, ротавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса папилломы, паповавируса, цитомегаловируса, эхиновируса, арбовируса, хантавируса, вируса коксаки, вируса свинки, вируса кори, вируса краснухи, вируса полиомиелита, вируса иммунодефицита человека типа I (HIV I) и вируса иммунодефицита человека типа II (HIV II), любых пикорнавирусов, энтеровирусов, калицивирусов, любого из группы вирусов Норфолк, тогавирусов, таких как альфавирусы, флавивирусы, коронавирусов, вируса бешенства, вируса марбургской болезни, вирусов Эбола, вируса парагриппа, ортомиксовирусов, буньявирусов, аренавирусов, реовирусов, ротавирусов, орбивирусов, вируса типа I Т-клеточного лейкоза человека, вируса типа II Т-клеточного лейкоза человека, вируса иммунодефицита обезьян, лентивирусов, полиомавирусов, парвовирусов, вируса Эпштейна-Барр, вируса 6 герпеса человека, вируса 1 герпеса марышковых (В-вируса) и поксвирусов.

[0230] В одном варианте осуществления, антиген-мишень происходит из бактерии, например, выбранной из группы, состоящей из: видов *Neisseria*, видов *Streptococcus*, видов *S. mutans*, видов *Haemophilus*, видов *Moraxella*, видов *Bordetella*, видов *Mycobacterium*, видов *Legionella*, видов *Escherichia*, видов *Vibrio*, видов *Yersinia*, видов *Campylobacter*, видов *Salmonella*, видов *Listeria*, видов *Helicobacter*, видов *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, видов *Enterococcus*, видов *Clostridium*, видов *Bacillus*, видов *Corynebacterium*, видов *Borrelia*, видов *Ehrlichia*, видов *Rickettsia*, видов *Chlamydia*, видов *Leptospira*, видов *Treponema*.

[0231] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR составляют совместно в смеси с опухолеассоциированным антигеном (ТАА). ТАА может

представлять собой выделенный полипептид или пептид, может являться частью интактной клетки или частью лизата клеток опухоли. ТАА может представлять собой полинуклеотид, например, голый плазмидный или вирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий один или несколько ТАА. Примеры известных ТАА включают в себя, без ограничения, ассоциированные с меланомой антигены (MAGE-1, MAGE-3, TRP-2, гликопротеин мембраны меланосом gp100, gp75 и MUC-1 (муцин-1) ассоциированы с меланомой); СЕА (карциноэмбриональный антиген), который может являться ассоциированным, например, с раком яичников, меланомой или раком толстого кишечника; рецептор фолата альфа, экспрессируемый карциномой яичников; бета-субъединица (hCG β) свободного человеческого хорионического гонадотропина, экспрессируемая множеством различных опухолей, включая, но без ограничения, миелому; HER-2/neu, ассоциированный с раком молочной железы; антиген вируса энцефаломиелита HuD, ассоциированный с мелкоклеточным раком легкого; тирозингидроксилазу, ассоциированную с нейробластомой; простатический специфический антиген (PSA), ассоциированный с раком предстательной железы; CA125, ассоциированный с раком яичника; и идиотипические детерминанты В-клеточной лимфомы могут стимулировать опухолеспецифический иммунитет (приписываемый специфическому для идиотипа гуморальному иммунному ответу). Кроме того, показано, что антигены вируса типа 1 Т-клеточного лейкоза человека индуцируют специфические ответы CTL и противоопухолевый иммунитет против индуцированного вирусом Т-клеточного лейкоза человека у взрослых (ATL). См., например, Haupt, et al., *Experimental Biology and Medicine* (2002) 227:227-237; Ohashi, et al., *Journal of Virology* (2000) 74(20):9610-9616. Другие ТАА известны и находят применение в совместных составах с антителами против GITR.

[0232] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR составляют совместно с аутологичными клетками опухолей от пациента, или аллогенными клетками опухолей того же самого типа ткани от другого пациента.

Клетки опухолей могут находиться в форме интактных клеток, лизата клеток опухолей, апоптотических клеток опухолей или тотальной мРНК клеток опухоли. Клетки опухолей можно подвергать трансфекции для экспрессии полипептида, улучшающего или усиливающего иммуногенность клеток опухоли для пациента, например, подвергать трансфекции для экспрессии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Клетки опухолей могут происходить из любой злокачественной ткани, включая, без ограничения, эпителиальные злокачественные опухоли или карциномы, так же как саркомы и лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой меланому, рак яичника, рак почки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак молочной железы, глиому, фибросаркому, злокачественную опухоль кроветворных тканей или плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC). См., например, Pardee, *et al*, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264, и обсуждаемые в этом документе ссылки. В некоторых вариантах осуществления, клетка опухоли происходит, например, из рака поджелудочной железы, меланом, рака молочной железы, рака легкого, рака бронхов, колоректального рака, рака предстательной железы, рака желудка, рака яичника, рака мочевого пузыря, злокачественной опухоли головного мозга или центральной нервной системы, злокачественной опухоли периферической нервной системы, рака пищевода, рака шейки матки, злокачественной опухоли тела или эндометрия матки, злокачественной опухоли полости рта или глотки, рака печени, рака почки, рака яичка, рака желчных протоков, злокачественной опухоли тонкого кишечника или аппендикса, злокачественной опухоли слюнных желез, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли надпочечника, остеосаркомы, хондросаркомы и злокачественной опухоли кроветворных тканей.

[0233] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR составляют совместно с цитотоксическим средством. Например, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR составляют совместно с агонистическим антителом или антигенсвязывающей молекулой,

которые связываются с CD4+ CD25+ регуляторными Т-клетками (Трег) и уменьшают их количество или истощают их. Иллюстративные истощающие Трег антитела или антигенсвязывающие молекулы связываются с CD25 или CCR4. См., *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575 и обсуждаемые в этом документе ссылки.

[0234] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR составляют совместно с ингибитором коингибирующего сигнала. Иллюстративные ингибиторы включают в себя ингибиторы CTLA-4 и ингибиторы взаимодействия PD-1/PD-L1 (например, B7-H1). В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR составляют совместно с антителом, связывающим и ингибирующим CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR составляют совместно с антителом, связывающим и ингибирующим TIM3. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR составляют совместно с антителом, связывающим и ингибирующим LAG3. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR составляют совместно с антителом, связывающим и ингибирующим PD-1. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR составляют совместно с антителом, связывающим и ингибирующим B7-H1. См., например, *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575; и Melero, et al., *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509 и обсуждаемыми в нем ссылками. В конкретных вариантах осуществления, составы содержат биспецифическую молекулу, включающую антитело или антигенсвязывающую молекулу против GITR и ингибитор коингибирующего сигнала. В некоторых вариантах осуществления, составы содержат биспецифическую молекулу, включающую антитело или антигенсвязывающую молекулу против GITR и ингибитор CTLA4. В некоторых вариантах осуществления, составы содержат биспецифическую молекулу, включающую антитело или антигенсвязывающую молекулу против GITR и ингибитор TIM3. В некоторых вариантах осуществления, составы содержат биспецифическую молекулу, включающую антитело или антигенсвязывающую молекулу против GITR и ингибитор LAG3. В некоторых вариантах осуществления, составы содержат биспецифическую молекулу, включающую антитело или

антигенсвязывающую молекулу против GITR и ингибитор PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, составы содержат биспецифическую молекулу, включающую антитело или антигенсвязывающую молекулу против GITR и ингибитор B7H1.

Ингибиторы PD-1

[0235] В одном варианте осуществления, агонист GITR используют в комбинации с ингибитором PD-1, например, как описано в WO2015/026684. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-1 представляет собой антитело против PD-1, выбранное из ниволумаба, пембролизумаба или пидилизумаба.

[0236] В некоторых вариантах осуществления, антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб. Альтернативные наименования ниволумаба включают в себя MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 или BMS-936558. В некоторых вариантах осуществления, антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб (регистрационный номер регистрационный номер CAS: 946414-94-4). Ниволумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, специфически блокирующее PD1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, специфически связывающие PD1, описаны в US 8008449 и WO2006/121168. В одном варианте осуществления, ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб и обладает последовательностью, описанной в этих документах (или последовательностью, в основном идентичной или сходной с ней, например, последовательностью, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или выше идентичной указанной последовательности).

[0237] В некоторых вариантах осуществления, антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб (обозначаемый также как ламбролизумаб, MK-3475, MK03475, SCH-900475 или KEYTRUDA®; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, связывающее PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизированные антитела против PD-1 описаны в Hamid, O. *et al.* (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44, US 8354509 и WO2009/114335.

[0238] В одном варианте осуществления, ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб, описанный, например, в US

8354509 и WO 2009/114335, и обладает последовательностью, описанной в этих документах (или последовательностью, в основном идентичной или сходной с ней, например, последовательностью, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или выше идентичной указанной последовательности).

[0239] В некоторых вариантах осуществления, антитело против PD-1 представляет собой пидилизумаб. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональные антитело IgG1k, связывающее PD1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 описаны в WO2009/101611. Другие антитела против PD1 включают в себя AMP 514 (Amplimmune), среди прочих, например, антитела против PD1, описанные в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649.

[0240] В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-1 представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или связывающую PD-1 часть PD-L1 или PD-L2, слитую с константной областью (например, областью Fc из последовательности иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-1 представляет собой AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342), представляет собой слитый растворимый рецептор из PD-L2 и Fc, блокирующий взаимодействие между PD-1 и B7-H1.

[0241] В одном варианте осуществления, комбинация включает в себя молекулу антитела против GITR, например, как описано в настоящем документе, и антитело против PD-1, описанное, например, в WO 2015/112900, и обладающее последовательностью, описанной в этом документе (или последовательностью, в основном идентичной или сходной с ней, например, последовательностью, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или выше идентичной указанной последовательности).

Ингибиторы PD-L1 или PD-L2

[0242] В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-L1 представляет собой молекулу антитела. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор против PD-L1 выбран из YW243,55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105.

[0243] В некоторых вариантах осуществления, антитело против

PD-L1 представляет собой MSB0010718C. MSB0010718C (обозначаемое также как A09-246-2; Merck Serono) представляет собой моноклональное антитело, связывающее PD-L1. Пембролизумаб и другие гуманизированные антитела против PD-L1 описаны в WO2013/079174 и обладают последовательностью, описанной в этом документе (или последовательностью, в основном идентичной или сходной с ней, например, последовательностью, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или выше идентичной указанной последовательности).

[0244] В одном варианте осуществления, ингибитор PD-L1 представляет собой YW243.55.S70. Антитело YW243.55.S70 представляет собой антитело против PD-L1, описанное в WO 2010/077634 (последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи показаны в SEQ ID No. 20 и 21, соответственно), и обладает последовательностью, описанной в этом документе (или последовательностью, в основном идентичной или сходной с ней, например, последовательностью, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или выше идентичной указанной последовательности).

[0245] В одном варианте осуществления, ингибитор PD-L1 представляет собой MDX-1105. MDX-1105, известное также как BMS-936559, представляет собой антитело против PD-L1, описанное в WO2007/005874, и обладает последовательностью, описанной в этом документе (или последовательностью, в основном идентичной или сходной с ней, например, последовательностью, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или выше идентичной указанной последовательности).

[0246] В одном варианте осуществления, ингибитор PD-L1 представляет собой MDPL3280A (Genentech/Roche). MDPL3280A представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG1 с оптимизированным Fc, связывающее PD-L1. MDPL3280A и другие человеческие моноклональные антитела против PD-L1 описаны в Патенте США No.: 7943743 и Патентной публикации США No.: 20120039906.

[0247] В других вариантах осуществления, ингибитор PD-L2 представляет собой AMP-224. AMP-224 представляет собой слитый растворимый рецептор из PD-L2 и Fc, блокирующий взаимодействие между PD1 и B7-H1 (B7-DCIg; Amplimmune; например, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342).

Ингибиторы LAG-3

[0248] В одном варианте осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, включает в себя ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию используют для лечения злокачественной опухоли, например, злокачественной опухоли, описанной в настоящем документе, например, солидной опухоли или злокачественной опухоли кроветворных тканей. В некоторых вариантах осуществления, антитело против LAG-3 представляет собой BMS-986016. BMS-986016 (обозначаемое также как BMS986016; Bristol-Myers Squibb) представляет собой моноклональное антитело, связывающее LAG-3. BMS-986016 и другие гуманизированные антитела против LAG-3 описаны в US 2011/0150892, WO2010/019570 и WO2014/008218. В некоторых вариантах осуществления, антитело против LAG-3 представляет собой гуманизированное антитело против LAG3, описанное в WO2015/138920.

Ингибиторы TIM-3

[0249] В одном варианте осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, включает в себя ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию используют для лечения злокачественной опухоли, например, злокачественной опухоли, описанной в настоящем документе, например, солидной опухоли или злокачественной опухоли кроветворных тканей. Иллюстративные антитела против TIM-3 описаны в Патенте США No.: 8552156, WO 2011/155607, EP 2581113 и Патентной публикации США No.: 2014/044728. В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM3 представляет собой гуманизированное mAb АВТІМ3, описанное в WO2015/117002.

Ингибиторы CTLA-4

[0250] В одном варианте осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, включает в себя ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию используют для лечения злокачественной опухоли, например, злокачественной опухоли, описанной в настоящем документе, например, солидной опухоли или злокачественной опухоли кроветворных тканей.

[0251] Иллюстративные антитела против CTLA4 включают в себя

тримелимумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное из Pfizer, ранее известное как тицилимумаб, CP-675206); и ипилимумаб (антитело против CTLA-4, известное также как MDX-010, CAS No. 477202-00-9). Другие иллюстративные антитела против CTLA-4 описаны, например, в Патенте США No. 5811097.

[0252] Антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно также составлять совместно с одним или несколькими иммуностимулирующими средствами. Например, в некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR составляют совместно с иммуностимулирующим цитокином, например, IL-7, IL-12 или IL-15. Альтернативно, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять совместно с вторым иммуностимулирующим антителом. Например, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно также составлять совместно с агонистическим антителом или антигенсвязывающей молекулой из числа других членов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей. Иллюстративные вторые иммуностимулирующие мишени включают в себя, без ограничения, член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей TNFRSF4 (известный также как OX40) или член 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (известный также как TNFRSF9, 4-1BB или CD137). См., например, *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575; Pardee, et al, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264; и Melero, et al., *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509, и обсуждаемые в этих документах ссылки.

[0253] Антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно также составлять совместно с химиотерапевтическим средством. Выбранное средство зависит от состояния, подлежащего лечению, например, злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, такого как бактериальная инфекция, грибковая инфекция, вирусная инфекция или паразитическая инфекция. Антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять совместно с химиотерапевтическим средством, известным специалисту в данной области для лечения состояния заболевания, подлежащего лечению. Химиотерапевтические средства, например, для лечения злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний, известны в данной области, и описаны, например, в *Goodman and*

Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., Brunton, Lazo and Parker, Eds., McGraw-Hill (2006); 2010 *Physicians' Desk Reference (PDR)*, 64th Edition, Thomson PDR.

[0254] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять совместно с антинеопластическим средством. Иллюстративные антинеопластические средства, находящие применение для смешивания в композициях с антителами против GITR, включают в себя алкилирующие средства (например, азотистые иприты, этиленимины и метилмеламины, производное метилгидразина, алкилсульфонат, нитрозомочевину, триазены и координационные комплексы платины); антиметаболиты (например, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина; природные продукты (например, алкалоиды барвинка, таксаны, эпиподофиллотоксины, камптотецины, антибиотики и антрацендион). В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR составляют совместно с антиметаболитным антинеопластическим средством, например, аналогом фолиевой кислоты (например, метотрексатом, пеметрекседом, триметрексатом), аналогом пиримидина (например, 5-фторурацилом, капецитабином, цитарабином, гемцитабином), аналогом пурина (например, меркаптопурином, пентостатином, кладрибином, флударабином), или их смесью. В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR составляют совместно с алкилирующим антинеопластическим средством, например, азотистыми ипритами (например, мехлорэтамином, циклофосфамидом, ифосфамидом, мелфаланом, хлорамбуцилом), этилениминами (например, алтретамином) и метилмеламином (например, тиотепа), производными метилгидразина (например, прокарбазином), алкилсульфонатом (например, бусульфаном), нитрозомочевинной (например, кармустином, стрептозоцином), триазенами (например, декарбазином, темозололмидом) и координационными комплексами платины (например, цисплатином, карбоплатином, оксалиплатином).

[0255] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять

совместно с противовирусным средством. Иллюстративные противовирусные средства включают в себя, без ограничения, средства против вируса герпеса (например, ацикловир, цидофовир, фамцикловир, фоскарнет, тиовир, фомивирсен, ганцикловир, идоксуридин, пенцикловир, трифлуридин, валацикловир, валганцикловир, резиквимод); средства против гриппа (например, амантадин, озельтамивир, римантидин, занамивир, перамивир, E-118958); средства против гепатита (например, адефовир, дипивоксил, интерферон-альфа, ламивудин, энтекавир, клевудин, эмтрицитабин, телбувидин, тенофовир, вирамидин, BILN 2061, NM283) и другие противовирусные средства (например, рибавирин, имиквимод, марибавир, sICAM-1, плеконарил). Противовирусное средство может представлять собой средство против ретровирусов. Иллюстративные средства против ретровирусов включают в себя, без ограничения, зидовудин, диданозин, ставудин, зальцитабин, ламивудин, абакавир, тенофавир, эмтрицитабин, невирапин, эфавиренц, делавирдин, саквинавир, индинавир, ритонавир, нельфинавир, ампренавир, лопинавир, атазанавир, фосампренавир и энфувиртид.

[0256] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять совместно с антибактериальным средством. Иллюстративные антибактериальные средства включают в себя, без ограничения, сульфонамиды (например, сульфаниламид, сульфадиазин, сульфаметоксазол, сульфизоксазол, сульфацетамид), триметоприм, хинолоны (например, налидиксовая кислота, цинноксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, спарфлоксацин, флероксацин, перфлоксацин, левофлоксацин, гареноксацин и гемифлоксацин), метенамин, нитрофурантоин, пенициллины (например, пенициллин G, пенициллин V, метициллин, оксациллин, клоксициллин, диклоксициллин, нафциллин, ампициллин, амоксициллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин и пиперациллин), цефалоспорины (например, цефазолин, цефалексин, цефадроксил, цефокситин, цефаклор, цефprozил, цефуроксим, ацетил цефуроксима, лоракабеф, цефотетан, цефоранид, цефотаксим, цефподоксим, проксетил, цефибутен, цефдинир, цефдиторен, пивоксил,

цефтизоксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим и цефепин), карбапенемы (например, имипенем, азтреонам) и аминогликозиды (например, неомицин, канамицин, стрептомицин, гентамицин, торамицин, нетилмицин и амикацин).

[0257] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять совместно с противопаразитарным средством. Иллюстративные противопаразитарные средства включают в себя, без ограничения, противомаларийные средства (например, хинолины, включая хлороквин, мефлоквин, хинин, квинидин и примаквин; диаминопиримидины, включая пириметамин, сульфадоксин, тетрациклины, атоваквон и прогуанил); антипротозойные средства, включая амфотерицин, хлороквин, эфлорнитин, эметин, фумагиллин, 8-гидроксихинолины, меларсопрол, метронидазол, милтефосин, нифуртимокс, нитазоксанид, паромомицин, пентамидин, стибоглюконат натрия и сурамин.

[0258] В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять совместно с противогрибковым средством. Иллюстративные противогрибковые средства включают в себя, без ограничения, полиены (например, натамицин, римоцидин, филипин, нистатин, амфотерицин В, кандицин, и гамицин), имидазолы (например, миконазол, кетоконазол, клотримазол, эконазол, бифоназол, бутконазол, фентиконазол, изоконазол, оксиконазол, сертаконазол, сулконазол, тиокконазол), триазолы (например, флуконазол, итраконазол, изавуконазол, равуконазол, позаконазол, вориконазол, терконазол), тиазолы (например, абафунгин), аллиламины (например, тербинафин, аморолфин, нафтифин, бутенафин), эхинокандины (например, анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), бензойную кислоту, циклопирокс, толнафтат, ундециленовую кислоту, флуцитозин или 5-фторцитозин, гризеофульвин и галопротин.

Наборы

[0259] Композиции против GITR по настоящему изобретению можно предоставлять в наборе. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула против GITR, как правило, находится

во флаконе или контейнере. При необходимости, антитело может находиться в жидкой или высушенной (например, лиофилизированной) форме. Наборы могут содержать антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR по изобретению, как описано в настоящем документе, и необязательно, содержит также второе или третье средство. В некоторых вариантах осуществления, наборы содержат антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR по изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель. Антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно предоставлять в наборах с вторым или третьим средствами в одном и том же или в отдельных составах (например, в форме смесей или в отдельных контейнерах). Наборы могут содержать аликвоты антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих молекул против GITR, представленных для одной или нескольких доз. Если представлены аликвоты для множественных введений, дозы могут являться равномерными или меняющимися. Меняющиеся режимы дозирования могут являться увеличивающимися или уменьшающимися, при необходимости. Дозы антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы против GITR и второго средства могут независимо являться равномерными или меняющимися.

[0260] В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат антиген-мишень. Антиген-мишень, или вакцина, зависит от состояния заболевания, подлежащего лечению. Например, антиген-мишень может происходить из клетки опухоли, бактериальной клетки, гриба, паразита или вируса. Антиген-мишень может находиться в форме пептида, полипептида, клетки, полинуклеотида (например, голого плазмидного или вирусного вектора), при необходимости. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой опухолеассоциированный антиген. Иллюстративные антигены-мишени обсуждают в настоящем документе; другие, известные в данной области, также находят применение.

[0261] В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат цитотоксическое средство. Например, наборы могут содержать агонистические антитело или

антигенсвязывающую молекулу, которые связываются с CD4+ CD25+ регуляторными Т-клетками (Трег) и уменьшают их количество или истощают их. Иллюстративные истощающие Трег антитела или антигенсвязывающие молекулы связываются с CD25 или CCR4. См., *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575 и обсуждаемые в этом документе ссылки.

[0262] В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат ингибитор коингибирующего сигнала. Иллюстративные ингибиторы включают в себя ингибиторы CTLA-4, LAG3, TIM3 и/или ингибиторы взаимодействия PD-1/PD-L1 (например, B7-H1). В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат антитело, связывающее и ингибирующее CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат антитело, связывающее и ингибирующее LAG3. В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат антитело, связывающее и ингибирующее TIM3. В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат антитело, связывающее и ингибирующее PD-1. В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат антитело, связывающее и ингибирующее B7-H1. См., например, *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575; и Melero, et al., *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509, и обсуждаемые в этих документах ссылки.

[0263] В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат одно или несколько иммуностимулирующих средств. Например, в некоторых вариантах осуществления, наборы содержат иммуностимулирующий цитокин, например, IL-7, IL-12 или IL-15. Альтернативно, наборы могут содержать второе иммуностимулирующее антитело. Например, наборы могут содержать агонистическое антитело или антигенсвязывающую молекулу другого члена суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей. Иллюстративные вторые иммуностимулирующие мишени включают в себя, без ограничения, член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей TNFRSF4 (известный также как OX40) или член 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (известный также как TNFRSF9, 4-1BB или CD137). См., например, *Expert Opin*

Ther Patents (2007) 17(5):567-575; Pardee, et al, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264; и Melero, et al., *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509, и обсуждаемые в этом документе ссылки.

[0264] В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат химиотерапевтическое средство. Выбранное средство зависит от состояния, подлежащего лечению, например, злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, такого как бактериальная инфекция, грибковая инфекция, вирусная инфекция или паразитическая инфекция. Иллюстративные химиотерапевтические средства включают в себя любые антинеопластические, противовирусные, антибактериальные, противопаразитарные и противогрибковые средства, известные в данной области и описанные в настоящем документе.

Способы усиления ответов Т-клеток

Состояния, подлежащие лечению или предотвращению

[0265] Агонистические антитела и фрагменты антител против GITR по изобретению находят применение в усилении ответов CD4⁺ Т-помощников и CD8⁺ цитолитических Т-клеток у нуждающегося в этом пациента. Таким образом, антитела находят применение в улучшении или усилении ответа Т-клеток у пациента, например, для эффекта уменьшения, обращения, ингибирования или предотвращения заболевания, которому можно противостоять с помощью улучшенного или усиленного иммунного ответа. В одном аспекте изобретение относится к способам усиления ответа Т-клеток у нуждающегося в этом индивидуума, включающим в себя введение индивидууму терапевтически эффективного количества агонистического антитела или фрагмента антитела против GITR по изобретению, как описано в настоящем документе. В одном аспекте изобретение относится также к агонистическому антителу или фрагменту антитела против GITR для применения для усиления ответа Т-клеток у индивидуума. В следующем аспекте, изобретение относится к композиции, содержащей такое антитело или фрагмент антитела, для применения для усиления ответа Т-клеток у индивидуума.

[0266] Состояния субъекта, подлежащие лечению, включают в себя злокачественные опухоли и инфекционное заболевание. Для терапевтических целей, пациент может иметь злокачественную

опухоль или опухоль или инфекционное заболевание, например, бактериальную, вирусную, грибковую или паразитическую инфекцию. Для профилактических целей, пациент может находиться в ремиссии после злокачественной опухоли, или его может ожидать воздействие бактериальной, вирусной, грибковой или паразитической инфекции. Антитела могут также служить адъювантом для усиления или стимуляции, или быстрого развития иммунного ответа против первичного антигена или антигена-мишени, например, вакцины.

[0267] В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет злокачественную опухоль, как подозревают, имеет злокачественную опухоль, или находится в ремиссии после злокачественной опухоли. Злокачественные опухоли, подлежащие лечению с использованием антитела против GITR, обычно экспрессируют опухолеассоциированный антиген (TAA), как описано в настоящем документе. Злокачественные опухоли, подлежащие лечению, включают в себя, без ограничения, эпителиальные злокачественные опухоли или карциномы, так же как саркомы и лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой меланому, рак яичника, рак почки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак молочной железы, глиому или фибросаркому. См., например, Pardee, et al, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264, и обсуждаемые в этом документе ссылки. В некоторых вариантах осуществления, тип злокачественной опухоли выбран из группы, состоящей из: рака поджелудочной железы, меланом, рака молочной железы, рака легкого, рака бронхов, колоректального рака, рака предстательной железы, рака желудка, рака яичника, рака мочевого пузыря, злокачественной опухоли головного мозга или центральной нервной системы, злокачественной опухоли периферической нервной системы, рака пищевода, рака шейки матки, злокачественной опухоли тела или эндометрия матки, злокачественной опухоли полости рта или глотки, рака печени, рака почки, рака яичка, рака желчных протоков, злокачественной опухоли тонкого кишечника или аппендикса, злокачественной опухоли слюнных желез, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли надпочечника, остеосаркомы, хондросаркомы,

злокачественной опухоли кроветворных тканей и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC).

[0268] В одном аспекте изобретение относится к способам лечения роста злокачественной опухоли, экспрессирующей опухолеассоциированный антиген у нуждающегося в этом индивидуума, включающим в себя введение индивидууму терапевтически эффективного количества агонистического антитела или фрагмента антитела против GITR по изобретению, как описано в настоящем документе. Изобретение относится также к агонистическому антителу или фрагменту антитела против GITR по изобретению для применения для лечения роста злокачественной опухоли, экспрессирующей опухолеассоциированный антиген, у индивидуума. Изобретение, кроме того, относится к композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела по изобретению, для применения для уменьшения, ингибирования или предотвращения роста злокачественной опухоли, экспрессирующей опухолеассоциированный антиген у индивидуума.

[0269] В некоторых вариантах осуществления, представлены способы облегчения диагностики или прогнозирования злокачественной опухоли у индивидуума, включающие в себя использование агонистического антитела или фрагмента антитела против GITR по изобретению для детекции экспрессии GITR в опухоли или вблизи опухоли у индивидуума.

[0270] В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет инфекционное заболевание, например, бактериальную, вирусную, грибковую или паразитическую инфекцию. Агонистические антитела против GITR находят применение для уменьшения, ингибирования и/или предотвращения паразитической инфекции, например, филяриоза и лейшманиоза.

[0271] В некоторых вариантах осуществления, агонистические антитела против GITR находят применение в лечении вирусной инфекции, включая, без ограничения, инфекцию вирусом гепатита, например, инфекцию хронического гепатита С (HCV), инфекцию вирусом простого герпеса (HSV) или инфекцию вирусом иммунодефицита человека (HIV). В некоторых вариантах осуществления, агонистические антитела против GITR находят

применение для лечения вирусной инфекции, выбранной из группы, состоящей из: гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа, ветряной оспы, инфекции аденовирусом, вирусом простого герпеса типа I (HSV I), простого герпеса типа II (HSV II), чумы крупного рогатого скота, инфекции риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хантавирусом, вирусом коксаки, вирусом свинки, вирусом кори, вирусом краснухи, вирусом полиомиелита, вирусом иммунодефицита человека типа I (HIV I) и вирусом иммунодефицита человека типа II (HIV II), любым пикорнавирусом, энтеровирусом, калицивирусом, любым из группы вирусов Норфолк, тогавирусами, такими как альфавирусы, флавивирусы, коронавирусы, вирусом бешенства, вирусом марбургской болезни, вирусами Эбола, вирусом парагриппа, ортомиксовирусами, буньявирусами, аренавирусами, реовирусами, ротавирусами, орбивирусами, вирусом типа I Т-клеточного лейкоза человека, вирусом типа II Т-клеточного лейкоза человека, вирусом иммунодефицита обезьян, лентивирусами, полиомавирусами, парвовирусами, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом 6 герпеса человека, вирусом 1 герпеса мартышковых (В-вирусом) и поксвирусами.

[0272] В некоторых вариантах осуществления, агонистические антитела против GITR находят применение в лечении бактериальных инфекций, включая, без ограничения, инфекцию видами *Neisseria*, видами *Streptococcus*, видами *S. mutans*, видами *Haemophilus*, видами *Moraxella*, видами *Bordetella*, видами *Mycobacterium*, видами *Legionella*, видами *Escherichia*, видами *Vibrio*, видами *Yersinia*, видами *Campylobacter*, видами *Salmonella*, видами *Listeria*, видами *Helicobacter*, видами *Pseudomonas*, видами *Staphylococcus*, видами *Enterococcus*, видами *Clostridium*, видами *Bacillus*, видами *Corynebacterium*, видами *Borrelia*, видами *Ehrlichia*, видами *Rickettsia*, видами *Chlamydia*, видами *Leptospira*, видами *Treponema*.

Введение антител против GITR

[0273] Терапевт или ветеринар может начинать дозирование антител или фрагментов антител по изобретению, используемых в

фармацевтической композиции на уровнях, более низких, чем необходимые для достижения желательного терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до достижения желательного терапевтического эффекта. Как правило, эффективные дозы композиций по настоящему изобретению меняются в зависимости от множества различных факторов, включая конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности. Для введения антитела, дозы лежат в диапазоне приблизительно от 0,0001 до 100 мг/кг, и более обычно, от 0,01 до 5 мг/кг, от массы организма хозяина. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или лежать в диапазоне 1-10 мг/кг. Дозирование может являться ежедневным, еженедельным, один раз в две недели, ежемесячным, или более или менее частым, как необходимо или желательно. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз в каждые две недели или один раз в месяц, или один раз в каждые 3-6 месяцев.

[0274] В некоторых вариантах осуществления, вводят полинуклеотид, кодирующий антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR по изобретению. В вариантах осуществления, где средство представляет собой нуклеиновую кислоту, типичные дозы могут лежать в диапазоне приблизительно от 0,1 мг/кг массы тела вплоть до и включительно, приблизительно 100 мг/кг массы тела, например, между приблизительно 1 мг/кг массы тела и приблизительно 50 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления, они составляют приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 мг/кг массы тела.

[0275] Антитело или фрагмент антитела можно вводить в однократной или разделенных дозах. Антитело или фрагмент антитела обычно вводят за несколько раз. Интервалы между однократными дозами могут составлять неделю, две недели, месяц

или год, как необходимо или желательно. Интервалы могут также являться неравномерными, по показаниям измерения уровня в крови пациента антитела или фрагмента антитела против GITR. В некоторых способах, дозу корректируют для достижения концентрации в плазме антитела или фрагмента антитела 1-1000 мкг/мл, и в некоторых способах, 25-300 мкг/мл. Альтернативно, антитело или фрагмент антитела можно вводить в форме состава с замедленным высвобождением, в этом случае необходимо менее частое введение. Дозу и частоту меняют в зависимости от времени полужизни антитела или фрагмента антитела у пациента. Как правило, гуманизированные антитела обладают более длительным временем полужизни, чем химерные антитела и не относящиеся к человеку антитела. Дозу и частоту введения можно менять в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях, относительно низкие дозы вводят в относительно нечастые интервалы в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всей оставшейся жизни. При терапевтических применениях, иногда необходимы относительно высокие дозы в относительно короткие интервалы, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и предпочтительно, пока для пациента не будет показано частичное или полное облегчение симптомов заболевания. Затем, можно проводить введение пациенту в профилактическом режиме.

Совместное введение с вторым средством

[0276] В некоторых вариантах осуществления, антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно с вторым или третьим фармакологическим средством. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR и второе или третье средство можно вводить в форме смеси или в отдельных составах. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR и второе или третье средство можно вводить одновременно или последовательно. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR и второе или третье средство можно вводить посредством одного и того же способа

введения или посредством различных способов введения, при необходимости. Иллюстративные вторые средства и третьи средства для совместного введения с агонистическими антителами, фрагментами антител или антигенсвязывающими молекулами против GITR по настоящему изобретению включают в себя, без ограничения, первичные антигены или антигены-мишени, средства, увеличивающие иммуногенность клеток опухоли, средства, ингибирующие или супрессирующие коингибирующие сигналы. Агонистические антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно также вводить совместно с химиотерапевтическим средством, используемым для лечения состояния заболевания, подвергнутого лечению, например, для увеличения эффективности химиотерапевтического средства или для дополнительного усиления иммунного ответа против антигена-мишени. Агонистические антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR также находят применение в видах комбинированной терапии совместно с разработанными способами для лечения указанного состояния заболевания, например, радиоактивным облучением или хирургическим вмешательством.

[0277] Антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR по изобретению можно вводить совместно с первичным антигеном или антигеном-мишенью. Антиген-мишень или вакцина зависят от состояния заболевания, подлежащего лечению. Например, антиген-мишень может происходить из клетки опухоли, бактериальной клетки, гриба, вируса или паразита. Антиген-мишень может находиться в форме пептида, полипептида, клетки или полинуклеотида, при необходимости.

[0278] В некоторых вариантах осуществления, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с антигеном-мишенью из вируса, например, выбранного из группы, состоящей из: вируса гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа, ветряной оспы, аденовируса, вируса простого герпеса типа I (HSV I), вируса простого герпеса типа II (HSV II), вируса чумы крупного рогатого скота, риновируса, эховируса, ротавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса папилломы, паповавируса,

цитомегаловируса, эхиновируса, арбовируса, хантавируса, вируса коксаки, вируса свинки, вируса кори, вируса краснухи, вируса полиомиелита, вируса иммунодефицита человека типа I (HIV I) и вируса иммунодефицита человека типа II (HIV II), любых пикорнавирусов, энтеровирусов, калицивирусов, любого из группы вирусов Норфолк, тогавирусов, таких как альфавирусы, флавивирусы, коронавирусов, вируса бешенства, вируса марбургской болезни, вирусов Эбола, вируса парагриппа, ортомиксовирусов, буньявирусов, аренавирусов, реовирусов, ротавирусов, орбивирусов, вируса типа I Т-клеточного лейкоза человека, вируса типа II Т-клеточного лейкоза человека, вируса иммунодефицита обезьян, лентивирусов, полиомавирусов, парвовирусов, вируса Эпштейна-Барр, вируса 6 герпеса человека, вируса 1 герпеса марышковых (В-вируса) и поксвирусов.

[0279] В некоторых вариантах осуществления, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с антигеном-мишенью из бактерии, например, выбранной из группы, состоящей из: видов *Neisseria*, видов *Streptococcus*, видов *S. mutans*, *Haemophilus*, видов *Moraxella*, видов *Bordetella*, видов *Mycobacterium*, видов *Legionella*, видов *Escherichia*, видов *Vibrio*, видов *Yersinia*, видов *Campylobacter*, видов *Salmonella*, видов *Listeria*, видов *Helicobacter*, видов *Pseudomonas*, видов *Staphylococcus*, видов *Enterococcus*, видов *Clostridium*, видов *Bacillus*, видов *Corynebacterium*, видов *Borrelia*, видов *Ehrlichia*, видов *Rickettsia*, видов *Chlamydia*, видов *Leptospira*, видов *Treponema*.

[0280] В некоторых вариантах осуществления, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с опухолеассоциированным антигеном (ТАА). ТАА может представлять собой выделенный полипептид или пептид, может являться частью интактной клетки или частью лизата клеток опухоли. Иллюстративные ТАА обсуждают выше; другие, известные в данной области, также находят применение.

[0281] В некоторых вариантах осуществления, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с аутологичными клетками опухолей от пациента,

или аллогенными клетками опухолей того же самого типа ткани от другого пациента. Клетки опухолей могут находиться в форме интактных клеток, лизата клеток опухолей, апоптотических клеток опухолей или тотальной мРНК клеток опухоли. Клетки опухолей можно подвергать трансфекции для экспрессии полипептида, улучшающего или усиливающего иммуногенность клеток опухоли для пациента, например, подвергать трансфекции для экспрессии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Клетки опухолей могут происходить из любой злокачественной ткани, включая, без ограничения, эпителиальные злокачественные опухоли или карциномы, так же как саркомы и лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой меланому, рак яичника, рак почки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак молочной железы, глиому или фибросаркому. См., например, Pardee, *et al*, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264, и обсуждаемые в этом документе ссылки. В одном варианте осуществления, клетка опухоли происходит, например, из рака поджелудочной железы, меланом, рака молочной железы, рака легкого, рака бронхов, колоректального рака, рака предстательной железы, рака желудка, рака яичника, рака мочевого пузыря, злокачественной опухоли головного мозга или центральной нервной системы, злокачественной опухоли периферической нервной системы, рака пищевода, рака шейки матки, злокачественной опухоли тела или эндометрия матки, злокачественной опухоли полости рта или глотки, рака печени, рака почки, рака яичка, рака желчных протоков, злокачественной опухоли тонкого кишечника или аппендикса, злокачественной опухоли слюнных желез, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли надпочечника, остеосаркомы, хондросаркомы, злокачественной опухоли кроветворных тканей и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC).

[0282] В некоторых вариантах осуществления, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с цитотоксическим средством. Например, антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с

агонистическим антителом или антигенсвязывающей молекулой, которые связываются с CD4+ CD25+ регуляторными Т-клетками (Трег) и уменьшают их количество или истощают их. Иллюстративные истощающие Трег антитела или антигенсвязывающие молекулы связываются с CD25 или CCR4. См., *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575, и обсуждаемые в этом документе ссылки.

[0283] В некоторых вариантах осуществления, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с ингибитором коингибирующего сигнала. Иллюстративные ингибиторы включают в себя ингибиторы CTLA-4, LAG3, TIM3 и/или ингибиторы взаимодействия PD-1/PD-L1 (например, B7-H1). В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR вводят совместно с антителом, связывающим и ингибирующим CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR вводят совместно с антителом, связывающим и ингибирующим TIM3. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR вводят совместно с антителом, связывающим и ингибирующим LAG3. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR вводят совместно с антителом, связывающим и ингибирующим PD-1. В некоторых вариантах осуществления, антитела против GITR вводят совместно с антителом, связывающим и ингибирующим B7-H1. См., например, *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575; и Melero, et al., *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509, и обсуждаемые в этих документах ссылки.

[0284] Антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно также вводить совместно с одним или несколькими иммуностимулирующими средствами. Например, в некоторых вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител против GITR вводят совместно с иммуностимулирующим цитокином, например, IL-7, IL-12 или IL-15. Альтернативно, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно вводить совместно с вторым иммуностимулирующим антителом. Например, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно также вводить совместно с агонистическим антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающей молекулой из числа других членов

суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей. Иллюстративные вторые иммуностимулирующие мишени включает в себя, без ограничения, член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей TNFRSF4 (известный также как OX40) или член 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (известный также как TNFRSF9, 4-1BB или CD137). См., например, *Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575; Pardee, et al, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264; и Melero, et al., *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509, и обсуждаемые в этих документах ссылки.

[0285] Антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно также вводить совместно с химиотерапевтическим средством. Выбранное средство зависит от состояния, подлежащего лечению, например, злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, такого как бактериальная инфекция, грибковая инфекция, вирусная инфекция или паразитическая инфекция. Антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно вводить совместно с химиотерапевтическим средством, известным специалисту в данной области для лечения состояния заболевания, подлежащего лечению. Иллюстративные химиотерапевтические средства обсуждают выше; другие, известные в данной области, также находят применение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0286] Фигура 1A-1D иллюстрирует эпитопное картирование mAb против GITR по изобретению. На фигуре 1A изображены результаты водородно/дейтериевого обмена в сочетании с анализами масс-спектрометрии (HDXMS) с использованием слитых белков Fc-GITR (верхняя и средняя кривая) и HIS-GITR (нижняя кривая) и исходного Ab MAB1. Нумерация отражает удаление последовательности сигнального пептида нативного GITR (ак 1-26). На фигуре 1B изображены схемы конструкций с N-концевой делецией, полученных с использованием внеклеточного домена из GITR человека (hGITR ECD). На фигуре 1C изображены результаты связывания MAB4 и MAB5 с конструкциями ECD hGITR. N-концевая делеция богатого цистеином домена 1 (CRD1) из внеклеточного домена (ECD) GITR человека (hGITR) прекращает связывание MAB4 и MAB5 с hGITR. Сходные результаты получены для MAB7 (данные не

представлены). На фигуре 1D изображены результаты аланинового сканирующего мутагенеза. MAB7 связывалось со всеми мутантными белками за исключением мутанта GITR E78A. Проводили анализы связывания ForteBio™, и результаты также подтвердили потерю связывания MAB7 с мутантным белком hGITRE78A (данные не представлены). Результаты относятся к области ECD GITR, включая CRD1 и включая E78 (SEQ ID NO:88: RPTGGPGCGPGRLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHC GD) в качестве области и потенциального эпитопа, вовлеченного в связывание MAB1 и MAB7 (исходного mAb).

[0287] На **фигуре 2A-2E** изображены результаты экспериментов связывания антитела MAB против GITR. Фигура 2A и 2B иллюстрирует, что MAB4 и MAB5 специфически связывают GITR человека и яванского макака (2A), но не грызунов (2B), как определено посредством анализов ELISA. Фигура 2C иллюстрирует, что MAB7 разделяет сходный профиль связывания GITR человека и яванского макака, но не GITR мыши, посредством анализа ELISA. Фигура 2D иллюстрирует, что MAB7 конкурирует со связыванием GITR-лиганд, как определено посредством конкурентных анализов FACS. Фигура 2E иллюстрирует результаты анализов ELISA, показывающих, что антитела против GITR по изобретению (например, MAB4, MAB5) не связывают другие члены суперсемейства рецепторов TNF (TNFRSF). Анализ на чипах Protagen™ также подтвердил, что антитела не связываются с другими белками, не являющимися мишенями (не показано).

[0288] На **фигуре 3A-3D** показана внутриклеточная передача сигналов в клетках 293, сконструированных для экспрессии GITR. Фигура 3A иллюстрирует, что рекомбинантный лиганд GITR человека (GITR-L) активирует внутриклеточную передачу сигналов в клетках 293, стабильно трансфицированных для сверхэкспрессии GITR человека. Фигура 3B иллюстрирует, что моноклональные антитела MAB4 и MAB5 активируют внутриклеточную передачу сигналов в клетках 293, трансфицированных для сверхэкспрессии GITR человека сравнимо с GITR-L, когда антитела являются перекрестно сшитыми (EC_{50} для GITRL составляет приблизительно 65 нМ по сравнению с

EC₅₀ приблизительно 2,5 нМ для агонистических антител в присутствии перекрестно сшивающего средства). Фигура 3С иллюстрирует, что перекрестно сшитое антитело MAB активирует внутриклеточную передачу сигналов в клетках, поскольку MAB7 и MAB8 стимулируют также активацию NFκB в клетках 293, стабильно трансфицированных GITR человека и репортерным геном NFκB-люцифераза, сходным образом с перекрестно сшитым MAB4. Фигура 3D иллюстрирует, что перекрестно сшитые MAB4 и MAB5 стимулируют активацию NFκB в клетках 293, стабильно трансфицированных GITR яванского макака и репортерным геном NFκB-люцифераза. Сходную активацию наблюдали для перекрестно сшитого MAB7 (данные не представлены).

[0289] На **фигуре 4А-4С** изображено, что костимулирующая активность *in vitro* MAB7 для Т-клеток зависит от активации Т-клеток. mAb против CD3 (ОКТ3), против CD28 (CD28.2) и против GITR перекрестно сшивали на бусинах (в соотношении 1:1:3) и затем инкубировали с PBMC. Фигура 4А иллюстрирует, что MAB7 является коактиватором CD4⁺ Т-клеток и стимулирует пролиферацию Т-клеток для CD4⁺ Т-клеток. Фигура 4В иллюстрирует, что MAB7 является коактиватором CD8⁺ Т-клеток и стимулирует пролиферацию Т-клеток для CD8⁺ Т-клеток. Фигура 4С иллюстрирует, что продукция цитокинов, например, продукция IFNγ, после привлечения TCR является увеличенной в сочетании с MAB7. Сходные результаты наблюдали для MAB4 и 5 (данные не представлены).

[0290] **фигура 5А-Д** иллюстрирует активность MAB7 в ADCC *in vitro* в клетках, экспрессирующих GITR на различных уровнях. На каждой из фигуры 5А, фигуры 5В, фигуры 5С и фигуры 5D изображены результаты активности ADCC с использованием контрольного антитела или антитела MAB7 при различных уровнях экспрессии GITR. MAB7 является способным индуцировать передачу сигнала посредством FcγRIIIa, с увеличенной активностью при увеличенных уровнях передачи сигнала посредством GITR.

[0291] **фигура 6А-6D** иллюстрирует, что GITR является функциональным у мышей с нокином hGITR-hGITRL. Спленоциты выделяли из мышей с нокином hGITR-hGITRL и культивировали либо

без стимуляции, либо со стимуляцией с использованием антител aCD3 и aCD8 в течение 48 часов, затем подвергали контрольному воздействию или воздействию MAB7 в различных концентрациях в течение 30 минут, затем фиксировали и окрашивали с использованием конъюгированных с флуорофором антител, и анализировали посредством проточной цитометрии. На фигуре 6А изображены результаты, показывающие повышающую регуляцию экспрессии hGITR на стимулированных CD8+ Т-клетках. На фигуре 6В изображены результаты связывания антитела против hGITR с Т-клетками по окрашиванию hFc, показывающие, что MAB7 может связываться с hGITR, экспрессированным на мышинных CD8+ Т-клетках. На фигуре 6С и 6D показано, что связывание MAB7 со стимулированными CD8+ Т-клетками коррелирует с увеличенной активацией Т-клеток, как показано по окрашиванию внутриклеточного pIKK (6С) и по активации Т-клеток (6D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

[0292] Фигура 7А-7С иллюстрирует, что MAB7 является функциональным *in vivo*. Мышей с двойным нокином hGITR-hGITRL с развившимися опухолями Colon26 обрабатывали с использованием однократной дозы носителя ($n=8$ /временную точку) или антитела MAB7 ($n=10$ /временную точку). На фигуре 7А изображены результаты измерения опухолей дважды в неделю и объем опухоли, рассчитанный с использованием уравнения $(L \times W^2)/2$. Показанные данные получены для группы временной точки пятнадцать (15) суток. На фигурах 7В и 7С изображены результаты для цельной крови, и на фигурах 7С и 7D изображены результаты для опухолей, собранных через 3 суток после дозирования и анализированных посредством проточной цитометрии по экспрессии hGITR на клеточной поверхности иммуноцитов. (* $p < 0,05$, **** $p < 0,00005$).

[0293] Фигура 8А-8Е иллюстрирует, что MAB7 вызывает противоопухолевый иммунный ответ на опухоли Colon26 *in vivo*. Мышей с двойным нокином hGITR-hGITRL с развившимися опухолями Colon26 обрабатывали с использованием однократной дозы носителя ($n=8$ /временную точку) или MAB7 ($n=10$ /временную точку). На фигуре 8А изображены результаты для регуляторных Т-клеток через 3 суток после дозирования. На фигуре 8В-8С изображены результаты для

уровней лимфоцитов (8В) и активированных CD8+ Т-клеток (8С), присутствующих в участке опухоли после обработки для опухолей на 15 сутки после дозирования. Абсолютное количество клеток нормализовали по размеру опухоли, чтобы учитывать значительные различия размера опухолей между группами носителя и обработки МАВ7. На фигуре 8D показано соотношение Тэфф/Трег, полученное в результате у подвергнутых обработке животных, как определено по общему количеству внутриопухолевых активированных CD8+ Т-клеток по сравнению с CD4+ FOXP3+ Трег для получения соотношений Тэфф/Трег. На фигуре 8Е изображены результаты анализов спленоцитов для очищенных CD8+ Т-клеток, инкубированных с клетками опухолей Colon26 *ex-vivo*, и измерения ответа CTL с использованием анализа ELISPOT IFNg. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$).

[0294] Фигура 9А–9С иллюстрирует, что экспрессия PD-1 подвергается повышающей регуляции на CD8+ Т-клетках в опухолях Colon26, так же как в селезенке, после обработки мышинным суррогатным антителом против GITR, DTA-1. Для суспензий отдельных клеток из целых опухолей или целых селезенок получали профили проточной цитометрии после 2 доз DTA-1. На фигуре 9А показаны результаты для положительных по PD-1 клеток, оцененные как процент от общего количества CD19-CD3+CD8+ Т-клеток. На фигуре 9В показаны результаты для положительных по PD-1 клеток, нормализованные по размеру опухолей, по абсолютному количеству PD-1+CD19-CD3+CD8+ Т-клеток на мм³ объема опухоли. На фигуре 9С изображены результаты, показывающие что экспрессия PD-1 подвергается положительной регуляции на CD8+ Т-клетках в селезенках мышей, несущих опухоль Colon26, после обработки DTA-1. Положительные по PD-1 клетки оценивали как процент от общего количества CD19-CD3+CD8+ Т-клеток. (* $p < 0,05$ и **** $p < 0,0005$).

[0295] Фигура 10 иллюстрирует, что комбинации антител против GITR и против PD-1 обеспечивают преимущество в отношении выживаемости по сравнению с контролем изотипа. Изображены результаты в моделях Colon26 на мышах, обработанных антителом против GITR (IgG2a-DTA-1) и против PD-1 (RMP1-14), отдельно или в комбинации, по сравнению с контролем изотипа.

[0296] Фигура 11 иллюстрирует экспрессию LAG3 (первый

столбец), TIM3 (средний столбец) и PD1 (правый столбец) после обработки антителом против GITR, против PD-1 и против GITR/против PD-1 в комбинациях у мышей с развившимися опухолями Colon26 по сравнению с обработкой контролем для изотипа Ab. Изображены результаты в моделях Colon26 на мышах, обработанных антителом против GITR (IgG2a-DTA-1) и против PD-1 (RMP1-14) отдельно или в комбинации по сравнению с контролем для изотипа. В верхнем ряду показаны результаты для образцов опухолей, и в нижнем ряду изображены результаты для образцов селезенки. Экспрессия LAG3, TIM3 и PD1 подвергается повышающей регуляции в CD8+ Т-клетках в опухолях Colon26 после обработки α-GITR и α-PD1. Экспрессия PD-1 подвергается повышающей регуляции в CD8+ Т-клетки в опухолях Colon26 после обработки антителами против GITR/ против PD-1 в комбинации.

ПРИМЕРЫ

Получение агонистических антител для GITR MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 и MAB8

[0297] Человеческие антитела MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 и MAB8 получали посредством модификации мышинового моноклонального агонистического антитела для GITR MAB1 для получения большей гомологии последовательности с человеческим зародышевым антителом. MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 и MAB8 сохраняют эпитопную специфичность, аффинность и перекрестную реакционную способность по отношению к GITR яванского макака исходного мышинового антитела, MAB1. MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 и MAB8 обладают намного более высокой гомологией с человеческой зародышевой последовательностью, чем исходное мышинное антитело, и таким образом, иммунная система человека должна быть более толерантной к ним.

[0298] Мышиное моноклональное MAB1 модифицировали, чтобы приблизить его белковую последовательность к человеческой зародышевой последовательности и уменьшить его иммуногенность с использованием технологической платформы Humaneered®, доступной из KaloBios, (South San Francisco, CA (во всемирной сети web на kalobios.com)). Антитела Humaneered® являются очень близкими к

человеческим антителам по последовательностям V-области, которые обладают высокой гомологией с человеческой зародышевой последовательностью, сохраняя в то же время специфичность и аффинность исходного или эталонного антитела (Публикация патента США 2005/0255552 и 2006/0134098). По этому способу сначала идентифицируют минимальные детерминанты специфичности связывания антигена (BSD) в переменных областях тяжелой и легкой цепи эталонного Fab (как правило, последовательности внутри CDR3 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи). Поскольку эти BSD тяжелой и легкой цепи сохраняются во всех библиотеках, сконструированных в ходе процесса, каждая библиотека является сфокусированной на эпитопе, и полученные антитела Humaneered® сохраняют эпитопную специфичность исходного мышиного антитела.

[0299] Затем получают библиотеки полноразмерных цепей (в которых полноразмерная переменная область легкой или тяжелой цепи заменена на библиотеку человеческих последовательностей) и/или кассетные библиотеки (в которых часть переменной области тяжелой или легкой цепи мышиного Fab заменена на библиотеку человеческих последовательностей). Бактериальную систему секретиции используют для экспрессии членов библиотеки в форме фрагментов Fab антитела, и проводят скрининг библиотеки по Fab, которые связывают антиген, с использованием анализа связывания с отпечатком колоний (CLBA). Положительные клоны подвергают дальнейшей характеристике для идентификации клонов с наивысшей аффинностью. Идентифицированные человеческие кассеты, поддерживающие связывание в контексте оставшихся мышиных последовательностей, комбинируют в окончательном скрининге библиотеки для получения полностью человеческих V-областей.

[0300] Полученные Fab антитела Humaneered® обладают последовательностями V-сегмента, происходящими из человеческих библиотек, сохраняют короткие последовательности BSD, идентифицированные внутри областей CDR3, и обладают человеческими зародышевыми каркасными областями 4. Эти Fab переводят в полноразмерные IgG посредством клонирования переменных областей тяжелых и легких цепей в экспрессирующие

IgG векторы. Антитела Humaneered®, полученные этим способом, сохраняют специфичность связывания исходного, мышиного антитела, как правило, обладают эквивалентной или более высокой аффинностью для антигена, чем исходное антитело, и обладают V-областями с высокой степенью идентичности последовательности по сравнению с человеческими зародышевыми генами антител, на уровне белка.

Способы

Получение мышиного mAb против GITR MAB1

[0301] Трансгенных мышей Bcl-2 (C57BL/6-Tgn (bcl-2), линия 22 wehi) иммунизировали с использованием N-концевой области из GITR человека (ак 26-161) с использованием способа, называемого повторной иммунизацией во множестве участков (RIMMS) (McIntyre GD. Hybridoma 1997) с последующим получением гибридом из мышей с высоким титром. Гибридому, секретирующую MAB1, идентифицировали и отбирали с использованием сэндвич-ELISA против hGITR и анализа репортерных генов с NFκB для подтверждения связывания hGITR и агонистической активности.

Клонирование мышинных V-областей

[0302] ДНК варибельной области из мышиного моноклонального MAB1 амплифицировали посредством RT-ПЦР с РНК, полученной из линии клеток гибридомы, с использованием стандартных способов. Варибельную область тяжелой цепи амплифицировали с кДНК MAB1 с использованием HV3 (5'- GGGTCTAGACACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTC-3' (SEQ ID NO:95)) и HCconstant (5'- GCGTCTAGAAYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC-3' (SEQ ID NO:96)). Варибельную область легкой цепи амплифицировали с той же самой кДНК с использованием LV3 (5'- GGGTCTAGACACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA-3' (SEQ ID NO:97)) и LCconstant (5'- GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG-3' (SEQ ID NO:19)). Продукты варибельных областей тяжелой и легкой цепи вставляли в вектор pcDNA3.1, и последовательность подтверждали. Векторы для тяжелой и легкой цепи использовали в качестве матриц для ПЦР, включающей участки узнавания рестрикционных ферментов для клонирования в векторы KaloBios: Vh в KB1292-His

(модифицированный вариант KB1292, кодирующий С-концевой гибкий линкер и метку 6-His tag (SEQ ID NO:11) аминокислотной последовательности AAGASHNNNNH (SEQ ID NO:13) на CH1) по *NcoI* (5') и *NheI* (3'); Vк в KB1296 по *NcoI* (5') и *BsiWI* (3'). Затем эти отдельные векторы для тяжелой и легкой цепи объединяли в один бицистронный экспрессирующий Fab вектор KaloBios посредством рестрикционного расщепления с использованием *BssHII* и *ClaI*, и лигирования. Фрагменты Fab экспрессировали в *E. coli* с этого вектора. Этот Fab тестировали по связыванию с антигеном hGITR и обозначили как MAB1rFab.

Очистка Fab

[0303] Фрагменты Fab экспрессировали посредством секретиции из *E. coli* с использованием экспрессирующих векторов KaloBios. Клетки выращивали в среде 2 x YT до OD500 ~0,6. Экспрессию индуцировали добавлением IPTG до 100 мкМ и встряхиванием в течение 4 часов при 33°C. Собранные Fab получали из периплазматических фракций посредством осмотического лизиса и очистки посредством аффинной хроматографии с использованием колонок Ni-NTA, колонок HisTrap HP; GE Healthcare каталожный #17-5247-01) в соответствии со стандартными способами. Fab элюировали в буфер, содержащий 500 мМ имидазол и подвергали тщательному диализу против PBS pH7,4 без кальция и магния.

Конструирование библиотеки

[0304] Для ограничения комплексности для идентификации взаимодополняющих человеческих CDR, поддерживающих BSD-FR4 в связывании GITR человека, принимали способ кассетной библиотеки, в котором только часть исходного мышиного V-сегмента заменяли на библиотеку человеческих последовательностей. Исходная мышиная Vк MAB1 является наиболее близкой к человеческой зародышевой VкIII, поэтому смесь двух библиотек KaloBios, содержащих зародышевые линии VкIII (KB1423 и KB1424), использовали для получения кассетных библиотек Vк. Библиотеки KaloBios, содержащие зародышевые линии VH3 (KB1413, KB1414), использовали для конструирования кассетных библиотек Vh. Два типа кассет конструировали посредством перекрывающейся ПЦР: предварительные

кассеты (8C1VK3FE-01 и MAB1VN3FE-01), содержащие человеческие последовательности в кассетах FR1, CDR1 и FR2, и кассеты FR3 (MAB1VK3FR3-01 и MAB1VN3FR3-01)), содержащие человеческие последовательности в FR3, амплифицировали с использованием вышеупомянутых ограниченных зародышевых библиотек KaloBios. Каждую кассетную библиотеку Vh клонировали в вектор KB1292-His по *NcoI* (5') и *KpnI* (3'); каждую кассетную библиотеку Vk клонировали в вектор KB1296-B (модифицированный вариант вектора KaloBios KB1296, обладающий молчащим участком *HindIII*, добавленным в FR4) по *NcoI* (5') и *HindIII* (3'). Полученные плазмидные библиотеки Vh или Vk затем комбинировали с комплементарной цепью из оптимизированного исходного Fab (MAB1opVK или MAB1 opVN (например, предварительную библиотеку Vh комбинировали с оптимизированным эталонным вектором Vk) посредством расщепления посредством *BssHII* и *ClaI* и последующего лигирования для получения библиотек бицистронных векторов, экспрессирующих полноразмерные Fab.

[0305] Ни один из предварительных клонов VN3 не связывал GITR человека с высокой аффинностью, таким образом, конструировали вторую предварительную библиотеку VN3 (MAB1VN3FE-02). Эта библиотека содержит человеческие последовательности в FR1, FR2 и набор CDR2, кодирующих либо исходный мышинный остаток, либо выбранный человеческий зародышевый остаток во всех положениях. Последовательности области FR3 в этой библиотеке происходили из шести клонов, выбранных из библиотеки VN3FR3 (MAB1VN3FR3-01).

[0306] Конечную библиотеку полноразмерных цепей Vk (MAB1VK3FCL-01) конструировали посредством комбинации клонов из предварительной библиотеки VK и кассетной библиотеки VKFR3 с мутантными CDR2 VK, кодирующими либо исходный мышинный, либо выбранный человеческий зародышевый остаток во всех положениях. Полученную библиотеку полноразмерных цепей Vk клонировали в KB1296b по участкам *NcoI* и *HindIII*. Эту библиотеку полноразмерных цепей VK подвергали спариванию с рядом избранных клонов из библиотеки VN3FR3 для обеспечения экспрессии

функционального Fab и проводили скрининг посредством CLBS. Специфические для антигена клоны подтверждали посредством ELISA, специфической для GITR человека, и ранжировали посредством ELISA с титрованием по аффинности для антигена. Библиотеку полноразмерных цепей VH3 (MAB1VH3FcL-01) получали с использованием клонов, избранных из второй предварительной библиотеки VH3 (MAB1VH3FE-02), с набором последовательностей CDR2, содержащих либо исходный мышинный, либо человеческий остаток в каждом положении. Эту библиотеку полноразмерных цепей VH клонировали в KB1292-his по участкам *NcoI* и *KpnI*. Для получения конечной библиотеки, экспрессирующей полноразмерные цепи человеческого Fab, избранные клоны полноразмерных цепей VK комбинировали с библиотекой полноразмерных цепей VH по участкам *BssHII* и *ClaI*.

Общий способ ELISA

[0307] Слитый белок из рекомбинантного человеческого GITR и человеческого Fc (hGITR-hFc) использовали во всех анализах ELISA. Как правило, антиген hGITR-hFc, разведенный в PBS pH 7,4, связывали с 96-луночным микропланшетом для титрования при 200 нг/лунку посредством инкубации в течение ночи при 4°C. После промывки три раза с использованием PBST, планшет блокировали с использованием раствора 1% BSA в PBS в течение одного часа при 37°C, и затем промывали один раз с использованием PBST. Затем содержащую Fab клеточную среду или разведенный, очищенный Fab (50 мкл) добавляли в каждую лунку. После инкубации при 37°C в течение одного часа, или инкубации в течение ночи при 4°C, планшет промывали три раза с использованием PBST. Конъюгат HRP с антителом против человеческой цепи каппа (Sigma #A7164), разведенный 1:5000 в PBST (50 мкл) добавляли в каждую лунку, и планшет инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Планшет промывали три раза с использованием PBST, затем 100 мкл субстрата TMB SureBlue (KPL #52-00-03) добавляли в каждую лунку, и планшет инкубировали в течение приблизительно 10 мин при комнатной температуре. Планшет считывали при 650 нм в спектрофотометре.

ELISA для титрования аффинности

[0308] Для оценки связывания антигена избранными продуцирующими Fab клонами, разработали ELISA для титрования аффинности. В этом анализе скомбинированы две последовательные стадии ELISA: на первой стадии, с использованием антител козы против человеческого Fab (Jackson ImmunoResearch Lab #109-005-097) для связывания и антител козы против человеческой каппа (Sigma #A7164) для детекции, измеряют концентрации Fab в среде после культивирования клеток для нормализации количества Fab, используемого во втором ELISA для титрования антигена; во втором ELISA, обычном ELISA, специфическом для антигена, получают кривую разведения для связывания антигена с таким же количеством исходного Fab. Посредством сравнения кривых разведения различных клонов идентифицируют клоны с высокой аффинностью.

ELISA связывания с отпечатками колоний (CLBA)

[0309] Скрининг библиотек антител Humaneered® для фрагментов Fab проводили в основном, как описано в (Публикации патентов США 2005/0255552 и 2006/0134098) с использованием нитроцеллюлозных фильтров, покрытых hGITR-hFC при 2,0 мкг/мл в PBS pH7,4. Fab, связанные с покрытым антигеном фильтром, детектировали с использованием конъюгата с HRP антитела козы против человеческой каппа (Sigma #A7164), разведенного 1:5000 in PBST, и блоты проявляли с использованием системы детекции для Вестерн-блоттинга ECL plus (GE Healthcare #RPN2132).

Удаление участка гликирования в MAB4

[0310] Участок гликирования «КН» в участке стыковки FR3 и CDR3 тяжелой цепи MAB4 удаляли посредством замены лизина на аргинин, или замены лизина на аргинин и гистидина на аспарагин. Превращения КН в RH и КН в RN осуществляли посредством мутагенеза на основе ПЦР с использованием плазмиды p50H в качестве матрицы ДНК. Обратный праймер (TCTGGCGCAGTAATACACGGCC, SEQ ID NO:110) включал аргинин вместо лизина; прямой праймер (NNKGCSTATGGCCATGATGGCG, SEQ ID NO:111) обладал вырожденным тринуклеотидом NNK в участке гистидина. Реакции ПЦР проводили с использованием 100 нг матрицы, 0,2 мкМ каждого праймера, 200 мкМ

dNTP, и 2,5 ед. ДНК-полимеразы pfuUltraII (Stratagene) в объеме реакционной смеси 50 мкл. Условия ПЦР представляли собой 94°C в течение 3 мин в течение 1 цикла; 94°C в течение 15 секунд, 52°C в течение 20 секунд и 65°C в течение 5 минут в течение 30 циклов; и наконец, 1 цикл при 72°C в течение 5 минут. DpnI (2 ед.) добавляли в реакционную смесь для ПЦР и инкубировали при 37°C в течение 30 минут для удаления матрицы p50H. Амплифицированные варианты тяжелой цепи MAB4 разделяли в 1% геле с SYBR и очищали с использованием набора для очистки из геля Qiagen. Очищенный из геля продукт ПЦР обрабатывали полинуклеотид-киназой ДНК Т4, лигировали и трансформировали химически компетентные клетки DH5 α (Invitrogen) с отбором в присутствии ампициллина.

[0311] Клоны, несущие тяжелую цепь MAB7 и MAB8, отбирали посредством ПЦР колоний с использованием прямого (GCSTTTCTCTCCACAGG, SEQ ID NO:112) и обратного (GGCAAACAACAGATGGCTGG, SEQ ID NO:113) праймеров, следуя протоколу GoTaqClear (Promega). Условия ПЦР представляли собой 94°C в течение 3 минут в течение 1 цикла; 94°C в течение 10 секунд, 55°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 45 секунд 25 раз; и наконец, один цикл при 72°C в течение 5 минут. Реакционные смеси после ПЦР очищали для секвенирования посредством инкубации образцов при 37°C в течение 30 минут и 80°C в течение 15 минут с экзонуклеазой I и щелочной фосфатазой креветки. Образцы после ПЦР секвенировали, и результаты анализировали с использованием программного обеспечения Clone Manager.

Производство и очистка антител

[0312] Полученные антитела MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 и MAB8 (IgG1 каппа) получали посредством совместной трансфекции следующими векторами клеток 293 Freestyle с использованием реагента для трансфекции 293fectin (Invitrogen #51-0031) в соответствии с протоколом производителя.

MAB2 – p35H+p35каппа

MAB3 – p38H+p38каппа

MAB4 – p50H+p35каппа

MAB5 - p51H+p35kappa

MAB6 - p56H+p35kappa

MAB7 - pMAB7H+p35kappa

MAB8 - pMAB8H+p35kappa

[0313] Антитело очищали из супернатантов клеток 293 Freestyle с использованием 5-мл колонки HiTrap HP с белком А (GE Healthcare #17-0403-03). Антитело элюировали с использованием буфера для элюции IgG (Pierce #21004), и буфер меняли на PBS посредством диализа. Аффинную хроматографию с белком А проводили в системе для жидкостной хроматографии AKTA-FPLC (GE Healthcare).

ELISA специфичности

[0314] Для ELISA специфичности, неочищенный лизат клеток получали из бактерий, экспрессирующих члены семейства TNFRSF. Для предотвращения неспецифического связывания с планшетом, добавляли 50 мкл 5% BSA на мл бактериального лизата. 96-луночный планшет HisGrab Nickel (Pierce #15142) покрывали содержащим TNFRSF бактериальным лизатом при 100 мкл лизата/BSA на лунку и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет промывали три раза с использованием PBST, затем MAB разводили до 0,5 мкг/мл в 10% FBS в PBS, и 100 мкл добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и затем промывали три раза с использованием PBST. Антитело против человеческой каппа (Sigma #A7164), конъюгированное с HRP разводили 1:5000 в 1:1 PBST: 10% FBS в PBS, и 100 мкл добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, и затем промывали три раза с использованием PBST. 100 мкл субстрата TMB SureBlue добавляли в каждую лунку, и планшет инкубировали в течение приблизительно 10 мин при комнатной температуре до остановки реакции с использованием 100 мкл/лунку 2 N H₂SO₄. Планшет считывали при 450 нм в спектрофотометре.

ELISA (связывание GITR, перекрестная реактивность для видов, аланиновое сканирование)

[0315] Связывание MAB с GITR из различных видов, различных конструкций аланиновых мутантов или внеклеточного домена GITR

оценивали с использованием 384-луночного планшета, покрытого внеклеточным доменом (ECD) GITR крысы, мыши, человека или яванского макака при 50 нг на лунку и инкубированного в течение ночи при 4°C. Планшет блокировали с использованием раствора 1% BSA в PBS в течение одного часа при комнатной температуре и затем промывали три раза с использованием PBST. Затем MAB разводили до 0,5 мкг/мл или 1 мкг/мл в PBS, и 20 мкл добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и затем промывали три раза с использованием PBST. Антитело против человеческой цепи каппа (Sigma #A7164), антитело против человеческой цепи гамма (Jackson ImmunoResearch 109-036-098), антитело козы против антитела мыши (Jackson ImmunoResearch 115-035-071), конъюгированные с HRP, разводили 1:5000 в блокирующем буфере (25 мкл) и добавляли в каждую лунку, или добавляли конъюгированное с hrp антитело против HIS (QIAGEN 1014992), разведенное 1:1000 в блокирующем буфере. Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, и затем промывали шесть раз с использованием PBST. 25 мкл субстрата TMB SureBlue (KPL 52-00-02) добавляли в каждую лунку, и планшет инкубировали в течение приблизительно 10 мин при комнатной температуре. Планшеты считывали при 650 нм в спектрофотометре.

Линии клеток, клетки

Линии клеток

[0316] Для получения линии клеток 293-hGITR-NFκB с репортерным геном, клетки 293 стабильно трансфицировали репортерным геном NFκB-люцифераза и GITR человека (или GITR яванского макака). Активацию пути передачи сигнала посредством GITR в этих клетках определяли посредством измерения уровней люциферазы, индуцированных внутри клеток после 24 час инкубации с GITR-L или агонистическим антителом. Для оценки эффектов перекрестного сшивания Ab, их инкубировали с избытком F(ab')₂ антитела козы против антител человека, специфического для фрагмента Fcγ₁ или белка A перед использованием в анализе репортерного гена.

[0317] Получали клональные линии клеток Daudi, экспрессирующие уровни GITR, наблюдаемые в иммунocyтaх человека.

[0318] Получали PBMC яванского макака, и связывание GITR определяли с использованием МАВ. Кратко, кровь яванского макака переносили в 50 мл конические пробирки (Falcon, #352098), затем разводили 1:2 в PBS (HyClone, #SH30256.01) и перемешивали. Разведенную кровь осторожно наслаивали поверх 18 мл 90% фикола Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare #17-1440-03, разведенного в PBS), и пробирки центрифугировали при 2000 x g в настольной центрифуге в течение 30 минут при комнатной температуре, без торможения. Слой плазмы осторожно удаляли без нарушения диффузного слоя PBMC поверх фикола. Затем PBMC осторожно собирали, и PBS добавляли к выделенным PBMC, пока объем в конической пробирке не составлял 45 мл, перемешивали, и затем центрифугировали при 300 x g в настольной центрифуге в течение 15 минут при комнатной температуре. Супернатант осторожно отбирали и добавляли 4 мл 1x лизирующего раствора BD (BD #555899), и образцы осторожно перемешивали на встряхивателе. После инкубации при комнатной температуре в темноте в течение 3 минут, 40 мл PBS добавляли к каждому образцу, и их центрифугировали при 200 x g в настольной центрифуге в течение 10 минут при комнатной температуре. Супернатант осторожно отбирали, и осадок промывали два раза в 45 мл PBS перед центрифугированием при 200 x g в настольной центрифуге в течение 10 минут при комнатной температуре. Полученный осадок фильтровали и ресуспендировали при 1×10^6 клеток/мл в среде для тестирования CTL (CTLT-005), дополненной пенициллином/стрептомицином/глутамином (HyClone #SV30082.01). 100 мкл очищенных PBMC яванского макака помещали в 96-луночный круглодонный планшет (Corning, #3799). Для активации PBMC, 100 мкл активированных тозилем гранул dynabeads M-280 (Life Technologies #142.04), конъюгированных с SP34-2/ антителами CD28.2 добавляли в каждую лунку. Использовали соотношение 3:1 CD3/CD28 бусин к PBMC, и планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования клеток при 37°C в течение 48 часов. Для

окрашивания на сутки 0, 200 мкл PBMC помещали в 96-луночный круглодонный планшет (Corning, #3799). Для образцов, стимулированных в течение 48 часов, 100 мкл супернатанта осторожно удаляли, и оставшееся содержимое лунки осторожно ресуспендировали, и 200 мкл переносили в планшет для окрашивания FACS.

FACS

[0319] Получали планшеты с клетками, ресуспендированными в 200 мкл холодного PBS. Закрепляемый краситель LIVE/DEAD (Life Technologies #L23105) разводили в 50 мкл DMSO и 1 мкл разведенного красителя добавляли/мл холодного PBS, и осадки клеток немедленно ресуспендировали в 100 мкл раствора LIVE/DEAD в PBS, инкубировали в течение 30 минут на льду, с защитой от света, затем промывали и ресуспендировали в 100 мкл холодного буфера для FACS, содержащего 2 мкг/мл MAB7 или контрольного антитела для изотипа IgG1 человека, и планшеты инкубировали в течение 30 минут на льду с защитой от света. Промывали и ресуспендировали в 100 мкл коктейля антител (антитело против CD3 человека с PerCP Cy5.5 (BD #552852), антитело против CD4 человека с Alexa Fluor 700 (BD #560836), антитело против CD8 человека с V450 (BD #561426), антитело против CD25 человека PE-Cy7 (BD #561405) и затем антитело против антител человека с PE в буфере для FACS (Jackson Immuno #109-116-098)), и затем планшеты инкубировали в течение 30 минут на льду с защитой от света и затем центрифугировали в настольной центрифуге при 3200 об./мин в течение 1 минуты при 4°C. Клетки промывали в буфере для FACS, затем ресуспендировали в 100 мкл BD CytoFix (BD #554655), и планшеты инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре с защитой от света, затем промывали дважды и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS. Планшеты накрывали фольгой (Beckman Coulter, #538619) и хранили при 4°C до готовности для считывания. На сутки считывания FACS планшет центрифугировали в настольной центрифуге при 3200 об./мин в течение 1 минуты, и 50 мкл CML латексных бусин (Life Technologies #C37259), 4×10^5 /мл в буфере для FACS, добавляли в

каждую лунку. Планшеты считывали на проточном цитометре BD Fortessa, и данные анализировали с использованием FlowJo.

Трансгенные мыши

[0320] Мышей с нокином hGITR получали посредством замены полной кодирующей последовательности (экзонов и интронов) GITR мыши на последовательность кДНК GITR человека. Нетранслируемые последовательности выше иницирующего кодона и ниже стоп-кодона происходят из генома мыши. Нацеливание генов выполняли стандартными способами в клетках ES BALB/c с использованием нацеливающих векторов, несущих гомологичные плечи, происходящие из BALB/c. Несколько клонов клеток ES идентифицировали посредством ПЦР и подтверждали посредством Саузерн-блоттинга содержание точного нокина кДНК человека. В соответствии со стандартными способами эмбриологии мышей, положительные клоны клеток ES инъецировали в бластоцисты, которые переносили псевдобеременным реципиентным суррогатным матерям для получения химерного потомства. Самцов химерных мышей скрещивали с самками BALB/c, экспрессирующими рекомбиназу Cre в их зародышевой линии, для вырезания фланкированной loxP кассеты устойчивости к неомицину. Для одного из клонов получили белое потомство, указывающее на передачу зародышевой линии ES клеток-мишеней. Вырезание фланкированной loxP кассеты подтверждали посредством генотипирования ПЦР. На последующей стадии скрещивания с мышами BALB/c дикого типа удаляли рекомбиназу Cre.

[0321] Мышей с нокином hGITRL получали посредством замены мышьиной кодирующей части экзона 1 на человеческую последовательность кДНК GITRL с последующим сигналом поли-А бычьего гормона роста. Все манипуляции с клетками ES и эмбриологические манипуляции с мышами выполняли способами, сходными со способами, описанными выше. Мышей с двойным нокином hGITR-hGITRL получали посредством скрещивания двух линий-основателей на протяжении 2 поколений для получения гомозиготных мышей с двойным нокином.

Функциональные анализы

[0322] Функциональную активность МАВ тестировали в анализе

репортерных генов с NFκB по агонистической активности. МАВ разводили до 6 мкг/мл в PBS и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в присутствии/в отсутствие 3-кратного избытка перекрестно сшивающего средства фрагмента F(ab')₂ козы против антитела человека, специфического для Fcγ. Альтернативно, МАВ разводили до 6 мкг/мл в PBS и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в присутствии/в отсутствие 2-кратного избытка белка А. Затем 10 мкл инкубированного МАВ добавляли в 384-луночный белый планшет для анализа с прозрачным дном. Линию клеток НЕК-293, стабильно трансфицированных hGITR и репортерным геном с NFκB, разводили до 5×10⁵ клеток/мл, и 20 мкл суспензии клеток добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 24 часов при 37°C в инкубаторе для культивирования клеток. 30 мкл Cell Bright Glo добавляли в каждую лунку, и планшет считывали по люминесценции в Acquest.

[0323] Способность МАВ блокировать связывание лиганда оценивали с использованием исходных клеток НЕК293 с репортером NFκB, и стабильные клетки с hGITR использовали в конкурентных анализах связывания и в анализе FACS. Кратко, собранные клетки рассеивали при 1×10⁶ клеток на мл, 100 мкл на лунку, в 96-луночный круглодонный планшет для FACS (Corning), затем ресуспендировали в 200 мкл холодного буфера FACS (1X PBS+1% FBS-HI+0,1% азид натрия) на лунку. Получали раститровку человеческого лиганда GITR от 270 нМ до 1,52 пМ в буфере для FACS при 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 часа на льду с защитой от света, клетки промывали, затем получали 4 нМ растворы контрольного антитела для изотипа или МАВ и добавляли с соответствующие лунки при 100 мкл на лунку, и планшеты инкубировали в течение 1 часа на льду с защитой от света, клетки промывали, затем конъюгированное с PE антитело козы против антитела человека для детекции (Jackson ImmunoResearch), полученное при разведении 1:100 в буфере для FACS, добавляли при 100 мкл на лунку, и планшеты инкубировали в течение 30 минут на льду с защитой от света. Клетки промывали в буфере для FACS, затем клетки фиксировали с использованием 100 мкл на лунку BD

CytoFix (BD Biosciences) и инкубировали в течение следующих 15 минут на льду с защитой от света. Фиксированные клетки промывали дважды, ресуспендировали в конечном объеме 150 мкл на лунку буфера для FACS, и образцы анализировали в течение 1 недели в проточном цитометре BD Fortessa (BD Bioscience).

[0324] Агонистическую активность MAB можно также наблюдать для первичных Т-клеток, экспрессирующих эндогенные уровни GITR, посредством пролиферации и секреции цитокинов из первичных Т-клеток. MAB конъюгировали с активированными тозилем бусинами M-280 (Invitrogen #142.04) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых экспериментах антитела - агонисты CD3 (ОКТ3) и CD28 (CD28.2) также конъюгировали с бусинами. 1×10^5 свежеочищенных меченных CFSE PBMC человека рассеивали в 10 мкл среды для тестирования CTL (CTL #CTLW-010) в 96-луночный круглодонный планшет для культивирования клеток. 100 мкл конъюгированных с MAB бусин затем добавляли в соотношении 1 Т-клетка: 1 бусина. Затем планшеты инкубировали в течение 3 суток при 37°C в инкубаторе для культивирования клеток. Уровни секретированных цитокинов в среде измеряли с использованием мультиплексного анализа MSD, согласно инструкциям производителя. Клетки окрашивали с использованием антител против CD4, CD8a, CD25, GITR и красителя LIVE/DEAD, после окрашивания клетки фиксировали и считывали в проточном цитометре. Пролиферацию каждого типа CD4 и CD8 клеток оценивали посредством окрашивания CFSE и подсчет бусин добавляли до считывания FACS, чтобы позволить нормализацию образцов.

[0325] Костимулирующую активность MAB для Т-клеток также измеряли с использованием способа ELISpot для детекции IFN γ . Кратко, планшеты для ELISPOT (Millipore MSIPS4510) получали посредством покрытия с использованием 70% этанола в течение 2 минут с последующей промывкой PBS и инкубацией в течение ночи с 50 мкг моноклонального антитела против IFN γ в PBS (Mabtech 3321-3). Очищенные CD8+ Т-клетки выделяли из селезенок мышей, обработанных носителем или MAB7 через 15 суток после дозирования. Т-клетки рассеивали в покрытые планшеты для ELISPOT

при $0,25 \times 10^6$ клеток на лунку в среде для CTL (CTL Test-medium (CTL CTLT-005), 1 mM HEPES (Mediatech MT25-060-C1), 2 mM L-глутамин (Mediatech MT25-005-C1), 1 mM пируват натрия (Mediatech MT25-000-C1), 100 мкМ MEM заменимые аминокислоты (Mediatech MT25-025-C1), 66 мкМ 2-меркаптоэтанол (Gibco 21985-023), 100 ед./мл пен./стрепт. (Gibco 10378016). Клетки Colon26 обрабатывали с использованием добавки 10% ConA (BD Biosciences 354115) при 37°C в течение 48 часов для повышающей регуляции экспрессии МНС класса II и промывали средой для CTL перед добавлением Т-клеток. Клетки опухолей Colon26 (20000/лунку) добавляли к CTL и инкубировали при 37°C в течение 24-48 часов. Затем планшеты промывали с использованием 0,05% Tween-20/PBS, и 10 мкг биотинилированного Mab против IFN γ (Mabtech R4-6A2-биотин) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Затем планшеты промывали с использованием 0,05% Tween-20/PBS и раствор Vectastain ABC (Вектор Labs PK6100) добавляли в каждую лунку, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем клетки промывали с использованием 0,05% Tween-20/PBS, и субстрат АЕС, полученный в соответствии с протоколом производителя (Sigma A6926), добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 4 минут при комнатной температуре. Затем планшеты промывали водопроводной водой, высушивали и сохраняли в темноте в течение 24 часов перед считыванием.

[0326] Способность МАВ индуцировать ADCC измеряли с использованием анализа репортера. В 96-луночном белом планшете (Perkin Elmer F6178) 2×10^3 клеток hG1TR-Daudi инкубировали с 4×10^4 клеток Jurkat-V158 (стабильно экспрессирующих вариант V158 Fc γ RIIIa человека и репортер NFAT) в соотношении 1 клетка Daudi к 20 клеткам Jurkat в 50 мкл RPMI+10% FBS. Равный объем МАВ добавляли в лунки, и планшеты инкубировали в течение 3 часов при 37°C в инкубаторе для культивирования клеток. После инкубации 60 мкл Bright-Glo добавляли в каждую лунку, и планшет считывали в люминометре.

[0327] Анализы спленоцитов *in vitro* проводили с использованием селезенки, выделенных из мышей. Кратко, селезенки

от мышей подвергали диссоциации посредством автоматизированной гомогенизации в 5 мл раствора для промывки AutoMACS (Miltenyi Biotech 130-091-222), содержащего 5% BSA (Miltenyi Biotech 130-091-376) с использованием пробирок gentleMACS C (Miltenyi Biotech 130-096-334) в устройстве для диссоциации gentleMACS Octo (Miltenyi Biotech 130-095-937). Гомогенаты пропускали через клеточное сито с размером пор 0,70 мкм (Fisher Scientific 22363548) и промывали 10 мл буфера AutoMACS. Спленоциты ресуспендировали и рассеивали при 100000 клеток/лунку в RPMI (HyClone SH30027,02)+10% человеческой сыворотки (Cellgro 35-060.C1)+1x пен./стрепт./L-глут. (Gibco 15 140-112) в 96-луночной планшете для культивирования тканей (Costar 3799). Для стимуляции Т-клеток, 0,4 мкг/мл антитела против CD3 мыши (eBioscience 16-0031-86) и 0,8 мкг/мл антитела против CD28 мыши (eBioscience 13-0281-86) добавляли в соответствующие лунки. Через 48 часов, клетки либо анализировали немедленно, либо стимулировали с использованием контрольного или терапевтического антитела в течение от 30 минут до 96 часов, окрашивали с использованием конъюгированных с флуорофором антител и анализировали посредством проточной цитометрии.

[0328] Проточная цитометрия: для поверхностных маркеров, клетки окрашивали с использованием антител против CD19 (BD Biosciences 562291), против CD8 (Biolegend 100725), против CD4 (eBioscience 25-0041), против CD69 (BD Biosciences 561238), против hGITR (Miltenyi Biotech 130-092-895) и против hIgG (Life Sciences A-10631) в течение 30 минут при 4С. Для внутриклеточного окрашивания, после инкубации с антителами против поверхности клеток, клетки промывали, фиксировали и пермеабелизовывали с использованием буфера FOXP3 Fix/Perm (Biolegend 421403) в соответствии с протоколом производителя, и инкубировали с антителом против фосфо-IK α /b (Cell Signaling 2697) или антителом против FOXP3 (eBioscience 50-4774-42) в течение 30 минут при 4С. Клетки считывали на цитометре BD LSRFortessa с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (BD Biosciences), и данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo

(TreeStar Inc.).

[0329] Суспензии отдельных клеток получали из опухолей и селезенки и окрашивали для анализа посредством проточной цитометрии. Например, клеточные маркеры оценивали с использованием следующих антител: α -CD8-BUV395 (клон 53-6.7, BD Biosciences 563786), α -CD19-APC-Cy7 (клон 6D5, BioLegend 115530), α -CD3-PerCp (клон 145-2C11, BD Bioscience 553067), α -PD-1-PE-Cy7 (клон RMP1-30, Biolegend 109110). Проточную цитометрию проводили в цитометрах BD LSRFortessa с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (BD Biosciences). Данные цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (FlowJo LLC). Графики получали и статистические расчеты выполняли с использованием программного обеспечения Prism (программного обеспечения GraphPad). Все данные показаны как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). Сравнения групп выполняли с использованием t-критерия Стьюдента с двусторонним 95% доверительным интервалом. Для всех статистических оценок уровень значимости устанавливали на $p < 0,05$. Указана значимость по сравнению с контрольной группой носителя, если не указано иначе.

[0330] Модели опухолей *in vivo*. Линию клеток мышинной карциномы ободочной кишки Colon26 получали из Отдела лечения и диагностики злокачественных опухолей в Национальном институте онкологии США (ампула: 0507238). Клетки мышинной карциномы Colon26 культивировали в среде RPMI 1640 (HyClone SH30027.02), дополненной 10% FBS (Gibco 10099-141), 10 mM HEPES (Gibco 15630-080) и 1 mM пируватом натрия (Gibco 11360-070). Самкам мышей с нокином hGITR-hGITRL в возрасте 8-10 недель инъецировали подкожно в бок $0,5 \times 10^6$ клеток Colon26 в 100 мкл RPMI. Опухоли измеряли с использованием цифрового штангенциркуля, и объем опухоли рассчитывали с использованием уравнения $(L \times W^2)/2$. Когда опухоли достигали среднего размера 180 мм^3 , мышей распределяли случайным образом и вводили дозы с использованием однократной внутрибрюшинной инъекции носителя (PBS) или терапевтического антитела (15 мг/кг) в 200 мкл PBS. Мышей умерщвляли, и опухоли

собирали для анализа посредством проточной цитометрии через 7 суток после введения дозы терапевтических антител. Все эксперименты на животных проводили в аккредитованном AAALAC отделе с использованием одобренных IACUC протоколов. Статистический анализ выполняли в программном обеспечении Prism с использованием t-критерия Стьюдента с двусторонним 95% доверительным интервалом или однофакторного ANOVA с коррекцией Тьюки.

[0331] Тестирование суррогатной модели GITR и Colon26 на мышах. Самок мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель из Charles River Labs использовали в качестве экспериментальных животных. Для имплантации, клетки ресуспендировали в 1x сбалансированном солевом растворе Хенкса (Hyclone Cat# SH30030.02) и имплантировали с помощью подкожной инъекции в нижнюю часть правого бока с использованием иглы 28 g (объем инъекции 100 мкл). После имплантации, мышей рандомизировали в соответствии с объемом опухоли. Мышам вводили дозы 5 мг/кг IgG2a-DTA-1 или IgG2a мыши для контроля изотипа посредством подкожной инъекции. Клон DTA-1, антитело крысы против GITR мыши (S. Sakaguchi, Kyoto University, Kyoto Japan), модифицировали для получения мышинового химерного IgG2a посредством слияния последовательностей вариабельной области DTA-1 с мышиными областями Fc IgG2a для получения IgG2a-DTA-1.

[0332] Комбинированная терапия. Для оценки активности *in vivo* суррогатного антитела против GITR (мышинового IgG2a-DTA-1), в комбинации с суррогатным антителом против PD-1 (крысы, IgG2a RMP1-14, Biolegend), самкам мышей BALB/cJ в возрасте 6-8 недель из Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) имплантировали подкожно выше правой подмышечной области 5×10^5 клеток Colon26 в объеме 100 мкл. Для имплантации, клетки Colon26 суспендировали в PBS Дульбекко, не содержащем кальция и магния, от Lonza (17-512F). Мышей регистрировали для исследования через десять суток после имплантации при среднем $\pm$ SEM объеме опухоли $115 \text{ мм}^3 \pm 7$. После случайного распределения в одну из 4 групп (n=10-16/группу), мышам вводили параллельно один раз в неделю в течение 2 недель

контроль изотипа (группа 1), RMP1-14 (10 мг/кг, группа 2), IgG2a-DTA-1 (5 мг/кг, группа 3) или комбинацию RMP1-14 и IgG2a-DTA (10 мг/кг и 5 мг/кг, соответственно, группа 4), как описано в таблице 6. Сутки 0 определяли как сутки рандомизации. Группа контроля изотипа включала в себя mIgG2a (Biolegend) при 5 мг/кг и IgG2a крысы (Biolegend) при 10 мг/кг. IgG2a-DTA и его контроль изотипа (mIgG2a) дозировали посредством подкожной инъекции при 5 мг/кг. RMP1-14 и его контроль изотипа (rIgG2a) дозировали посредством внутрибрюшинной инъекции. Объем дозирования составлял 10 мг/мл для всех обработок. Массы тела и объемы опухолей собирали два-три раза в неделю. Индивидуальных животных оценивали как достигших конечной точки, когда объемы опухолей становились равными или превышали 1200 мм³. Противоопухолевую активность регистрировали на основании изменений медианного времени до конечной точки (TTE), оцененных посредством анализа выживаемости Каплана-Мейера.

[0333] Комбинированная терапия. Для оценки экспрессии костимулирующих молекул после введения антител против GITR или антител против GITR в комбинации с антителами против PD-1, для суспензий отдельных клеток из целых опухолей и селезенок получали профили проточной цитометрии после 1 дозы антитела против GITR (клон IgG2a-DTA-1) или антитела против PD1 (клон RMP1-14), или антител против GITR+PD1 в комбинации. mIgG2a использовали в качестве контроля. Положительные по LAG3, TIM3 и PD-1 клетки оценивали как процент от общего количества CD3+CD8+ Т-клеток в опухолях и селезенках. Значения *p* рассчитывали с использованием *t*-критерия, **p*<0,05 и ***p*<0,005.

Результаты

Аминокислотные последовательности мышиной и эталонной V-области

[0334] Продукты RT-ПЦР из клеток гибридомы, экспрессирующих MAB1, секвенировали, и эти последовательности в большой степени (95% или выше) подтверждали на уровне белка с использованием масс-спектрометра ThermoElectron LTQ-Orbitrap. Затем переменные области тяжелой и легкой цепи MAB1 клонировали в векторы KaloBios для получения эталонного Fab MAB1rFab. Первую

аминокислоту в MAB1 необходимо было изменить с остатка аспарагина (N) на остаток глутаминовой кислоты (E), чтобы позволить клонирование в векторы KaloBios для получения эталонного Fab; таким образом, MAB1rFab обладает глутаминовой кислотой в первом положении VK. Fab MAB1rFab обладает интактными мышинными V-областями из MAB1, слитыми с человеческими константными областями. В дополнение к MAB1rFab, конструировали оптимизированный Fab, MAB1opFab. Несколько аминокислотных остатков каркасной области в MAB1rFab заменены на человеческие зародышевые остатки в MAB1opFab.

Анализ аффинности эталонного и оптимизированного эталонного Fab

[0335] Человеческие зародышевые остатки, включенные в оптимизированный эталонный MAB1opFab в FR1 и FR3, представляют собой остатки, определенные праймерами для ПЦР, использованными для амплификации репертуара человеческих V-сегментов, и таким образом, присутствуют у всех членов библиотек V-областей антитела Humaneered®. Оптимизированный эталонный Fab сконструирован для оценки того, изменяют или нет любые замены на человеческие зародышевые остатки свойства связывания Fab. Константы аффинности (K_a (1/M c), K_d (1/c) и KD (M)) MAB1rFab, MAB1opFab анализировали с использованием системы ForteBio Octed QK и биосенсоров с высоким уровнем связывания стрептавидина, покрытых биотинилированным hGITR-hFc. По сравнению с MAB1rFab, MAB1opFab обладал очень сходной K_d , но пятикратным улучшением K_a , указывающим на то, что замены аминокислот в MAB1rFab являются допустимыми.

Конструирование библиотеки и отбор Fab антитела Humaneered®

[0336] Предварительную библиотеку тяжелой и легкой цепи, и кассетную библиотеку FR3, семейства зародышевых последовательностей, ограниченных VH3 и VKIII, получали и подвергали скринингу посредством CLVA. Для VK, клоны, поддерживающие связывание с GITR человека, идентифицированы как из предварительной библиотеки VK (MAB1VK3FE-01), так и из кассетной библиотеки FR3 (MAB1VK3FR3-01). Для VH, клоны,

поддерживающие связывание с GITR человека, идентифицированы из кассетной библиотеки FR3 (MAB1VN3FR3-01), но не из предварительной библиотеки VN3 (MAB1VN3FE-01). Поскольку большинство членов предварительной библиотеки Vκ и кассетной библиотеки FR3 являлись положительными в CLBA, полный репертуар из этих двух библиотек использовали для конструирования библиотеки полноразмерных цепей Vκ (MAB1VK3FcL-01) посредством перекрывающейся ПЦР с мутагенным VK CDR2, который кодирует либо исходный мышиный, либо избранный человеческий зародышевый (VKIII L-16) остаток во всех положениях. Ряд положительных по отношению к hGITR клонов идентифицировали из библиотеки VN3FR3 (MAB1VN3FR3-01) посредством CLBA и подтвердили посредством специфической для GITR человека ELISA. Шесть из них использовали для спаривания с библиотекой полноразмерных цепей VK (MAB1Vκ3FcL-01), для обеспечения экспрессии функционального Fab и скрининга этой библиотеки.

[0337] Поскольку клонов, связывающих hGITR с высокой аффинностью, не идентифицировали из предварительной библиотеки VN (MAB1VN3FE-01), затем конструировали вторую предварительную библиотеку VN3 (MAB1VN3FE-02). Эта библиотека содержит либо исходный мышиный остаток, либо человеческий зародышевый (VN3 3-30) остаток в каждом положении последовательностей CDR1 и FR3 из шести выбранных клонов VNFR3. Множество связывающих hGITR членов идентифицировали как из библиотеки полноразмерных цепей VK (MAB1Vκ3FcL-01), так и из второй предварительной библиотеки VN (MAB1VN3FE-02). Эти клоны подтверждали посредством специфического для GITR человека анализа ELISA содержащих Fab супернатантов клеток и ранжировали по ELISA hGITR для титрования аффинности.

[0338] На основании ELISA hGITR для титрования аффинности, четыре клон полноразмерных цепей VK выбраны из библиотеки полноразмерных цепей VK (MAB1VK3FcL01), и шесть клонов выбраны из библиотеки MAB1VN3FE-02. Эти шесть клонов VN использовали в качестве остова для конструирования библиотеки полноразмерных цепей VN либо с остатком мышинного MAB1, либо с наиболее близким

человеческим зародышевым (VN3 3-30) остатком в каждом положении в CDR2. Этот репертуар полноразмерных цепей VH спаривали с четырьмя клонами полноразмерных цепей VK для получения конечной библиотеки полноразмерных цепей человеческого Fab. В CLVA идентифицировали множество связывающих hGfTR клонов, подтвержденных посредством ELISA с использованием соответствующего культурального супернатанта в качестве источника Fab. Пять клонов полноразмерных цепей человеческого Fab (MAV2, MAV3, MAV4, MAV5 и MAV6) выбраны на основании анализа последовательности ДНК и результатов ELISA hGfTR для титрования аффинности.

Тестирование аффинности Fab антитела Humaneered® для антигена GfTR с использованием анализа ForteBio Octet

[0339] Пять полноразмерных цепей человеческих Fab (MAV2, MAV3, MAV4, MAV5 и MAV6) экспрессировали и очищали. Затем кинетику связывания этих человеческих Fab сравнивали с кинетикой оптимизированного эталонного Fab (MAV1opFab) с использованием системы ForteBio Octet (цифровые данные обобщены в таблице 3).

Таблица 3. Аффинность Fab для GfTR человека

Fab	KD [M]
MAV1opFab (a) *	1,25E-8
MAV2 (a)	6,84E-9
MAV3 (a)	2,98E-9
MAV1opFab (b) *	6,59E-9
MAV4 (b)	2,43E-9
MAV5 (b)	3,74E-9
MAV1opFab (c) *	1,47E-8
MAV6 (c)	5,94E-9

*a, b, c обозначают три отдельных эксперимента Forte. Результаты представляют собой глобальное соответствие двух повторов образца.

Аминокислотная последовательность антител MAV2, MAV3, MAV4, MAV5, MAV6 и процент идентичности с человеческой зародышевой

последовательностью

[0340] Аминокислотные последовательности вариабельной области пяти Fab (MAV2, MAV3, MAV4, MAV5, MAV6) показаны в таблице 1. Процент идентичности с человеческими зародышевыми последовательностями пяти Fab определяли посредством выравнивания аминокислотных последовательностей Vh и Vk против одной зародышевой последовательности (VKIII L16/A27 и VH3 3-30, соответственно; Таблица 4). Остатки в CDRH3 и CDRL3 исключали из расчета для каждой цепи.

Таблица 4. Процент идентичности пяти Fab с человеческими зародышевыми последовательностями

Fab	VKIII L15/A27	VH3 3-30	Fv
MAV2	95%	86%	90%
MAV3	98%	85%	91%
MAV4	95%	85%	89%
MAV5	95%	83%	89%
MAV6	95%	82%	88%
MAV7	95%	85%	89%
MAV8	95%	85%	89%

Консервативность антигенного эпитопа GITR человека

[0341] Консервативность антигенного эпитопа оценивали посредством непрямого конкурентного ELISA. Все пять Fab блокировали связывание исходного мышиного антитела MAV1 с GITR человека, что указывает на то, что эти человеческие Fab сохраняют эпитопную специфичность исходного мышиного антитела.

Анализ антигенной специфичности MAV4 и MAV5 посредством ELISA

[0342] Для тестирования того, сохраняется ли антигенная специфичность исходного мышиного антитела MAV1 в IgG, MAV2, MAV3, MAV4 и MAV5, связывание антител с панелью человеческих TNFR тестировали в анализе ELISA. Результаты одного из таких анализов с MAV4 и MAV5 (фигура 2C) показывают, что MAV4 и MAV5 сохраняют высокую специфичность для GITR, сходную с мышиным антителом MAV1. Сходные результаты получены с MAV2, MAV3 и MAV6.

Связывание антитела с белком GITR человека и яванского макака, но не грызунов, в ELISA

[0343] Исходное мышиное антитело MAB1 связывается с белком GITR человека и яванского макака, но не грызунов. На фигурах 2А-В показано, что, подобно MAB1, антитела MAB4 и MAB5 являлись способными сходным образом связывать GITR человека и яванского макака, но не GITR грызунов. Сходные результаты получены для MAB6, 7 и 8.

[0344] Аффинность связывания антител-агонистов GITR MAB4 и MAB5 для GITR человека (hGITR) и яванского макака (cGITR), определяли посредством анализа Biacore. См. таблицу 5. Моноклональные антитела MAB4 и MAB5 связывают GITR человека с субнаномолярной аффинностью связывания (KD). Антитела MAB4 и MAB5 связывают GITR яванского макака наномолярной аффинностью связывания, приблизительно в 2-3 более низкой, чем аффинность связывания для GITR человека. Агонистические антитела против GITR по изобретению избирательно связываются с GITR человека и яванского макака в ряде биохимических анализов, включая анализы проточной цитометрии, ELISA, Biacore и анализ на чипах Protagen™.

Таблица 5. Аффинность связывания MAb с GITR человека и яванского макака

Антиген	mAb	KD (нМ)
hGITR	MAB4	0,684 ($\pm 0,331$)
hGITR	MAB5	0,973 ($\pm 0,167$)
hGITR	MAB7	4,29 ($\pm 0,14$)
cGITR	MAB4	1,78 ($\pm 0,543$)
cGITR	MAB5	1,87 ($\pm 0,520$)
cGITR	MAB7	3,67 ($\pm 0,09$)

[0345] Моноклональное антитело MAB7 связывается с CD4+ Т-клетками человека, так же как яванского макака. Анализ FACS выделенных PBMC яванского макака или человека показал, что MAB7 связывается с выделенными CD4+ Т-клетками. Кроме того, эксперименты FACS показали повышающую регуляцию GITR (посредством связывания MAB7) и CD25 после активации PBMC посредством CD3/CD28 (CD4+ Т-клетки). (данные не представлены)

Функциональная активность антител в анализах репортерных

ГЕНОВ И В АНАЛИЗАХ КЛЕТОК

[0346] Антитела анализировали в анализах репортерных генов по функциональной активности (фигура 3). Каждое из IgG MAB4, MAB5, MAB7 и MAB8 индуцирует активность NF κ B при перекрестном сшивании, на уровнях, сходных с лигандом GITR (GITR-L). См. фигуры 3A-D. Сходные результаты получены с MAB2, MAB3, и MAB6 (данные не представлены).

[0347] MAB7 конкурирует с лигандом GITR человека за связывание с экспрессирующей GITR человека стабильной линией клеток. Анализы конкуренции проводили в наборах из трех повторов значений, анализ конкуренции FACS показывает ингибирование связывания лиганда. См. фигуру 2D.

[0348] Для подтверждения функциональной активности по отношению к эндогенному GITR, антитела конъюгировали с бусинами и инкубировали с очищенными мечеными CFSE PBMC человека. MAB7 индуцирует усиление пролиферации как CD4⁺ Т-клеток (фигура 4A), так и CD8⁺ Т-клеток (фигура 4B) по сравнению с антителом для контроля изотипа. Это усиление пролиферации сопровождалось также увеличением секреции нескольких цитокинов, включая IFN γ (фигура 4C), TNF α , IL-10 и IL-13 (не показано). Сходные результаты получены с MAB4, MAB5 (не показано). Авторам настоящего изобретения удалось показать, что усиление пролиферации и продукции IFN γ индуцированные посредством MAB7, зависели от присутствия агонистических антител против CD3 и против CD28 на бусинах. При исключении этих костимулирующих антител, MAB не оказывал агонистических эффектов на CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки. Сходные результаты получены с MAB2, MAB3, MAB4; MAB5 и MAB6.

[0349] Обнаружено также, что MAB7 обладает способностью индуцировать передачу сигнала Fc γ RIIIa (показана корреляция с активностью ADCC) в анализе *in vitro*, когда присутствуют высокие уровни GITR. Для клеток Daudi-hGITR, инкубированных с MAB7 или контрольным Ab и с линией клеток Jurkat-V158, показали, что MAB7 является способным индуцировать передачу сигнала Fc γ RIIIa в анализе *in vitro*, и что способность MAB7 индуцировать передачу сигнала Fc γ RIIIa коррелирует с уровнем рецептора,

экспрессированным на поверхности клеток Daudi (т.е. более высокие уровни рецептора эквивалентны более сильной индукции передачи сигнала FcγRIIIa). См. фигуру 5.

[0350] hGITR экспрессируется на Т-клетках и является функциональным у мышей с нокином hGITR-hGITRL. Спленоциты выделяли из мышей дикого типа или мышей с нокином hGITR-hGITRL и культивировали либо без стимуляции, либо со стимуляцией с использованием антител α-CD3 и α-CD28 в течение 24, 48, 72 или 96 часов. Затем клетки окрашивали с использованием конъюгированных с флуорофором антител и анализировали посредством проточной цитометрии, показывая, что GITR человека экспрессируется, и костимуляция приводит к усилению профиля экспрессии GITR у мышей дикого типа или трансгенных мышей. Для спленоцитов, выделенных из мышей с нокином hGITR-hGITRL, показали индукцию экспрессии GITR в ответ на костимуляцию в культуре (фигура 6A). MAB7 эффективно связывается с hGITR, экспрессированным на CD8+ клетках (фигура 6B); и связывание MAB7 со стимулированными Т-клетками коррелирует с увеличенной активацией Т-клеток, как измерено по окрашиванию pIKK (фигура 6C) и маркеру активации Т-клеток CD25+ (фигура 6D).

[0351] MAB7 является функциональным *in vivo*. Мышей с двойным нокином hGITR-hGITRL с развившимися опухолями Colon26 обрабатывали с использованием однократной дозы носителя (n=8/временную точку) или антитела MAB7 (n=10/временную точку), как описано выше. Опухоли измеряли дважды в неделю, и объем опухоли рассчитывали с использованием уравнения $(L \times W^2)/2$. Для обработанных MAB животных показана задержка роста опухолей Colon26. Через трое суток после обработки, цельную кровь (фигуры 7B-7C) и опухоли (фигуры 7D-7E) собирали и анализировали посредством проточной цитометрии по экспрессии hGITR на клеточной поверхности иммуноцитов. Результаты позволяют предполагать занятость и сбрасывание hGITR, приводящие к уменьшению количества hGITR в группах обработки для регуляторных Т-клеток и Т-клеток помощников как в крови, так и в опухолях (*p<0,05, ****p<0,00005).

[0352] MAB7 вызывает противоопухолевый иммунный ответ

против опухолей Colon26 *in vivo*. Мышей с двойным нокином hGITR-hGITRL с развившимися опухолями Colon26 обрабатывали с использованием однократной дозы носителя (n=8/временную точку) или MAB7 (n=10/временную точку). На фигуре 8А изображены результаты для 3 суток после дозирования, показывающие, что количество Трег уменьшено у животных после обработки. На фигурах 8В-8С изображены результаты для 15 суток после дозирования, показывающие увеличенное количество лимфоцитов (8В) и увеличенное количество активированных CD8+ Т-клеток (8С), присутствующих в участке опухоли после обработки. Абсолютное количество клеток нормализовали по размеру опухоли, чтобы учитывать значительные различия размера опухолей между группами носителя и обработки MAB7. Результаты для MAB7 позволяют предполагать, что обработка приводит к увеличению соотношения Тэфф/Трег у подвергнутых обработке животных, как определено по общему количеству внутриопухолевых активированных CD8+ Т-клеток по сравнению с CD4+ FOXP3+ Трег. См. фигуру 8D. Кроме того, результаты анализов спленоцитов для очищенных CD8+ Т-клеток, инкубированных с клетками опухолей Colon26 *ex-vivo*, и измерения ответа CTL с использованием анализа ELISPOT IFN γ , позволяют предполагать увеличенный опухолеспецифический ответ IFN γ в CD8+ Т-клетках у животных после обработки MAB7. (*p<0,05, ***p<0,0005). См. фигуру 8Е.

[0353] Обработка мышей с использованием Ab против mGITR приводит к повышающей регуляции экспрессии PD-1 в опухолях и селезенке. Мышей с развившимися опухолями Colon26 обрабатывали с использованием двух доз контрольного антитела или мышинового антитела против mGITR. На фигуре 9A9C изображены результаты, показывающие, что экспрессия PD-1 подвергается повышающей регуляции на CD8+ Т-клетках в опухолях Colon26, так же как в селезенке, после обработки суррогатным антителом против GITR, IgG2a-DTA-1.

[0354] Комбинации антител против GITR и PD-1 обеспечивают преимущество в отношении выживаемости по сравнению с контролем для изотипа. Антитела против GITR (DTA-1) и против PD-1 (RMP1-14) вводили отдельно и в комбинации мышам с развившимися

опухолями Colon26. См. фигуру 10. Для комбинированного введения показано значимое преимущество в отношении выживаемости по сравнению с контролем для изотипа ($***p<0,0005$, попарное сравнение с использованием критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). Для монотерапии антителом против mG1TR (IgG2a-DTA-1) показано значимое преимущество в отношении выживаемости по сравнению с контролем для изотипа ($*p<0,05$ в попарном сравнении с использованием критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). Данные показывают, что комбинация IgG2a-DTA-1 и RMP1-14 обеспечивает статистически значимое преимущество в отношении выживаемости по сравнению с обработкой контролем для изотипа с медианным TTE более 42 суток (медианное TTE не достигнуто) ($P<0,0005$) по сравнению с 22 сутками для группы обработки контролем для изотипа. Примечательно, что для 3/10 животных достигнута полная регрессия (CR), для 2/10 животных достигнуто стабильное заболевание (SD). Монотерапия IgG2a-DTA-1 приводила к медианному TTE 30,5 суток ($P<0,05$), где для 3/10 животных достигнуто стабильное заболевание (SD). Медианная выживаемость в группе после обработки RMP1-14 составляла 24 суток, что не являлось статистически значимо отличным от группы обработки контролем для изотипа. Получали графики Каплана-Мейера и статистические расчеты проводили с использованием программного обеспечения Prism (программного обеспечения GraphPad). Сравнения групп осуществляли посредством попарного сравнения с использованием критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона. Для всех статистических оценок уровень значимости устанавливали на $p < 0,05$. Указана значимость по сравнению с контрольной группой носителя. Стабильное заболевание определяли как 3 последовательных измерения объема опухолей с изменением объема опухолей на 10% или менее.

Таблица 6: Комбинированная терапия			
IP=внутрибрюшинно; SC=подкожно			
Группа	Ab1 (5 мг/кг, SC)	Ab2	n/группу
1	mIgG2a	rIgG2a (10 мг/кг, IP)	n=10
2	RMP1-14 (10 мг/кг, IP) mIgG2a	mIgG2a (5 мг/кг, SC)	n=16

3	DTA-1	rIgG2a (10 мг/кг, IP)	n=10
4	DTA-1	RMP1-14 (10 мг/кг, IP)	n=10

[0355] Экспрессию костимулирующих молекул оценивали в опухолях после введения антитела против GITR или антитела против GITR в комбинации с антителом против PD-1. См. фигуру 11. Результаты профилей проточной цитометрии суспензий отдельных клеток для целых опухолей и селезенок после 1 дозы антитела против GITR или антитела против PD1, или антител против GITR+PD1 в комбинации показали увеличенную экспрессию LAG3, TIM3 и PD-1 на CD8+T-клетках в опухолях Colon26 после обработки антителом против GITR, против PD-1 и в комбинации. Для однократной комбинированной дозы показана повышающая регуляция экспрессии PD-1 в CD8+ клетках селезенки.

ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ

[0356] Полное содержание всех публикаций, патентов и номеров доступа, упомянутых в настоящем документе, таким образом, приведено в качестве ссылки, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что содержание каждой индивидуальной публикации или патента приведено в качестве ссылки.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0357] Несмотря на обсуждение конкретных вариантов осуществления рассматриваемого изобретения, вышеуказанное описание является иллюстративным, а не ограничивающим. Множество вариантов по изобретению станут очевидными специалистам в данной области после обзора этого описания и нижеследующей формулы изобретения. Полный объем изобретения следует определять по отношению к пунктам формулы изобретения, вместе с полным объемом их эквивалентов и описания, вместе с такими вариантами.

2017-05-04-06-26-34-186.txt
СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Brogdon, Jennifer
Cipolletta, Daniela
Dranoff, Glenn
Knee, Deborah
Wang, Fei

<120> КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА
И ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

<130> PAT056489-WO-PCT

<150> 62/061,644
<151> 2014-10-08

<150> 62/220,764
<151> 2015-09-18

<150> 62/198,673
<151> 2015-07-29

<160> 113

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1
<211> 241
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro
20 25 30

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg
35 40 45

Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu
50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His
65 70 75 80

Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro
85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys
100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys
115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro
130 135 140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala
145 150 155 160

Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys
165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu
180 185 190

Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val
195 200 205

Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu
210 215 220

Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp
225 230 235 240

Val

<210> 2
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro
 20 25 30

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg
 35 40 45

Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu
 50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His
 65 70 75 80

Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro
 85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys
 100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys
 115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Cys Trp Arg Cys Arg Arg Arg Pro Lys Thr
 130 135 140

Pro Glu Ala Ala Ser Ser Pro Arg Lys Ser Gly Ala Ser Asp Arg Gln
 145 150 155 160

Arg Arg Arg Gly Gly Trp Glu Thr Cys Gly Cys Glu Pro Gly Arg Pro
 165 170 175

Pro Gly Pro Pro Thr Ala Ala Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Gln Ala
 180 185 190

Ala Gly Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Arg Ala Leu Leu Pro Trp Gln
 195 200 205

Gln Lys Trp Val Gln Glu Gly Gly Ser Asp Gln Arg Pro Gly Pro Cys
 210 215 220

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Pro Cys Arg Arg Glu Arg Glu Thr Gln
 225 230 235 240

Ser Trp Pro Pro Ser Ser Leu Ala Gly Pro Asp Gly Val Gly Ser
 245 250 255

<210> 3

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro
 20 25 30

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg
 35 40 45

Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu
 50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His
 65 70 75 80

Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro
 85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys
 100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys
 115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro

130

135

140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala
 145 150 155 160

Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys
 165 170 175

Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu
 180 185 190

Arg Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala
 195 200 205

Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu
 210 215 220

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
 225 230

<210> 4
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 4

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg Cys
 1 5 10 15

Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu Glu
 20 25 30

Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys
 35

<210> 5
 <211> 40
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 5

Met	Cys	Val	Gln	Pro	Glu	Phe	His	Cys	Gly	Asp	Pro	Cys	Cys	Thr	Thr
1				5					10					15	

Cys	Arg	His	His	Pro	Cys	Pro	Pro	Gly	Gln	Gly	Val	Gln	Ser	Gln	Gly
			20					25					30		

Lys	Phe	Ser	Phe	Gly	Phe	Gln	Cys
		35				40	

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 6

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Gly	Val	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Val	Met
	50					55					60				

Ala	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 7

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ala Ser Leu Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 9

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 11

His His His His His His
1 5

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 13

Ala Ala Gly Ala Ser His His His His His His
1 5 10

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met
50 55 60

Ala Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 16
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (1)..(1)
<223> (E/Q)

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (14)..(14)

<223> (P/S)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (48)..(48)

<223> (L/V)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (60)..(60)

<223> (A/T)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (61)..(61)

<223> (A/S)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (63)..(63)

<223> (L/V)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (65)..(65)

<223> (A/G)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (97)..(97)

<223> (K/R)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (98)..(98)

<223> (H/N)

<400> 16

Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Xaa Xaa Ser Xaa Met

50

55

60

Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Xaa Xaa Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (27)..(27)
<223> (E/Q)

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (33)..(33)
<223> (L/V)

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (39)..(39)
<223> (K/R)

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (60)..(60)
<223> (D/A)

<400> 17

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Xaa Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Xaa Ala Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 19
<211> 29
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 19

gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg

<210> 20
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 21

2017-05-04-06-26-34-186.txt

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 22

Ser Tyr Gly Val Asp
1 5

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 23

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Val Met Ala
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 24

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ala Ser Leu Met Gly
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 25

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met Gly
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 26

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met Gly
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 27

Val	Ile	Trp	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	Met	Ala
1			5					10					15		

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (11)..(11)

<223> (A/T)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (12)..(12)

<223> (A/S)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (14)..(14)

<223> (L/V)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (16)..(16)

<223> (A/G)

<400> 28

Val	Ile	Trp	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Met	Xaa
1			5					10					15		

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 29

His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 30

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ser Asn Val Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (4)..(4)
<223> (E/Q)

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (10)..(10)
<223> (L/V)

<400> 32

Arg Ala Ser Xaa Ser Val Ser Ser Asn Xaa Ala
 1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 33

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 34

Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 36
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (1)..(1)
 <223> (E/Q)

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (14)..(14)
 <223> (P/S)

<400> 37

Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 38

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 39

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (13)..(13)

<223> (L/V)

<400> 40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa Gly
1 5 10

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (32)..(32)

<223> (K/R)

<400> 41

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Xaa
			20					25					30		

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 42

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 43

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
				20		

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 44

Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 45

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (5)..(5)

<223> (K/R)

<400> 46

Trp	Tyr	Gln	Gln	Xaa	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 47

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 48

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 49
<211> 32
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (4)..(4)
<223> (A/D)

<400> 49

Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 50

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 50

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 51
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 51
 caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct 180
 tcttctgtca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcca acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tca 363

<210> 52
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 52
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgttt ctccaggaga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtga gagtgttagc agtaatgtag cctggtagca gcagagacct 120
 ggccaggcac ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 240
gaagattttg cagtgtacta ctgcggccag agctatagct atccatttac ctttggccag 300
ggcaccaagc ttgaaattaa g 321

<210> 53
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 53
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact 180
gcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
tca 363

<210> 54
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 54
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catcccagac 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 240
gaagattttg cagtttacta ctgcggccag agctatagct atccatttac ctttggccag 300
ggcaccaagc ttgaaattaa a 321

<210> 55
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 55
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggggggaggc ttagttcagt ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatggtg tggactgggt tcgccaggct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct 180
 tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgccaac acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tca 363

<210> 56
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 56
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggggggaggc ttagttcagt ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatggtg tggactgggt tcgccaggct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact 180
 tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgccaac acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tca 363

<210> 57
 <211> 363
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 57

gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatggtg tggactgggt tcgccaggct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatggggtg gtggaggcac atattatact	180
tcttctctca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat	300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc	360
tca	363

<210> 58

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 58

aacattgtaa tgacccaatc tcccaaattcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
ttgagctgca aggccagtga gaatgtggat acttttgtat cctgggtatca acagaaacca	120
gaccactctc ctaaaactact gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagaccttg cagattatca ctgtggacag agttacagct atccattcac gttcggctcg	300
gggacaaagt tggaaataaa a	321

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 59

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp His Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 60

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 60

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60

acttgcaactg tctctggggtt ttcattaagg agctatgggtg tagactgggt tcgccagcct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac aaattataat 180

tcagctctca tggccaaact gagtatcagc aaagacaagt ccaagagcca agttttctta 240

aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccaa acatgcctat 300

ggtcacgacg gcgggttttgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 61
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 61

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

Ala Lys Leu Ser Ile Ser Lys Asp Lys Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 62

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ala
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 63

Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Phe Val Ser
 1 5 10

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 64

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Val Met
 50 55 60

Ala Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245

250

255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 66
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 66

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 67
 <211> 1353
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 67
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct 180
 tcttctgtca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcaccagc 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc 720
 ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780

cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac	840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac	900
aacagcacct acaggggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga aaagaccatc	1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag	1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca	1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg	1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac	1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag	1353

<210> 68

<211> 642

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 68

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgttt ctccaggaga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtga gagtgttagc agtaatgtag cctggtacca gcagagacct	120
ggccaggcac ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct	240
gaagattttg cagtgtacta ctgcggccag agctatagct atccatttac ctttggccag	300
ggcaccaagc ttgaaattaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcaagcgcg caacagccag	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
ctgtccagcc ccgtgacca gagcttcaac aggggcgagt gc	642

<210> 69
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 69

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ala Ser Leu Met
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165

170

175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370

375

380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 70

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 70

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 71

<211> 1353

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 71

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctggggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact 180

gcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggccttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgtc cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc 720
 ggaccctccg tgttcctggt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780
 cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac 900
 aacagcacct acaggggtgt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
 aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga aaagaccatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200
 gtgctggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

<210> 72
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 72
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catcccagac 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 240
 gaagattttg cagtttacta ctgcggccag agctatagct atccatttac ctttggccag 300
 ggcaccaagc ttgaaattaa acgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
 cccggggagg ccaagggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggagcagc gc 642

<210> 73
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290

295

300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 74
 <211> 1353
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 74

gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct	120
ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct	180
tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat	300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc	360
tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc	420
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag	660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc	720
ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780
cccgaggtga cctgcgtgggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac	840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac	900
aacagcacct acaggggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga aaagaccatc	1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag	1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca	1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg	1260
tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac	1320
accagaaga gcctgagcct gtccccgggc aag	1353

<210> 75

<211> 451

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 76
 <211> 1353
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 76
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggggggaggc ttagttcagt ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact 180
 tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcacccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc 720
 ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780

```

cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac      840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac      900
aacagcacct acaggggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga aaagaccatc     1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag     1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac      1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca     1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg     1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac     1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag                                  1353

```

<210> 77
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met
 50 55 60

Ala Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290

295

300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 78
 <211> 1353
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 78

gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact	180
tcttctctca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat	300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc	360
tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc	420
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag	660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc	720
ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780
cccgaggtga cctgcgtgggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac	840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac	900
aacagcacct acaggggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga aaagaccatc	1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag	1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca	1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg	1260
tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac	1320
accagaaga gcctgagcct gtccccggc aag	1353

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 79

Gly Phe Ser Leu Arg Ser Tyr
1 5

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 80

Trp Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 81

Ser Glu Asn Val Asp Thr Phe
1 5

<210> 82

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 82

Gly Ala Ser
1

<210> 83

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 83

Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
 1 5

<210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 84

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 85

Ser Glu Ser Val Ser Ser Asn
 1 5

<210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 86

Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

1 5

<210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (2)..(2)
 <223> (E/Q)

<400> 87

Ser Xaa Ser Val Ser Ser Asn
 1 5

<210> 88
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 88

Arg Pro Thr Gly Gly Pro Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg
 20 25 30

Asp Tyr Pro Gly Glu Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val
 35 40 45

Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp
 50 55

<210> 89
 <211> 98
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 89

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 90

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 91

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 92

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 92

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 93

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 94

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 95

<211> 37

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 95

gggtctagac accatggctg tcttggggct gctcttc

37

<210> 96

<211> 39

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 96

gcgtctagaa yctccacaca caggrrrccag tggatagac

39

<210> 97

<211> 40

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 97
gggtctagac accatggagw cacakwctca ggtctttrta

40

<210> 98
<211> 88
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 98

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85

<210> 99
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100
<211> 451
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 100

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260

265

270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 101

<211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 101
 gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagt ccggcggtc tctgagactg 60
 tcttgcgctg cctccggctt ctccctgtcc tcttacggcg tggactgggt gcgacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg ggtgggagtg atctggggcg gaggcggcac ctactacgcc 180
 tcttccctga tgggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240
 cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag acacgcctac 300
 ggccacgacg gcggcttcgc catggattat tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360
 tcc 363

<210> 102
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 102
 gagatcgtga tgaccagtc ccccgccacc ctgtctgtgt ctcccggcga gagagccacc 60
 ctgagctgca gagcctccga gtccgtgtcc tccaacgtgg cctggatatca gcagagacct 120
 ggtcaggccc ctcggtgct gatctacggc gcctctaacc gggccaccgg catccctgcc 180
 agattctccg gctccggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatctcccg gctggaaccc 240
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgcggccag tcctactcat accccttcac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 103
 <211> 1353
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 103
 gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagt ccggcggctc tctgagactg 60
 tcttgcgctg cctccggctt ctccctgtcc tcttacggcg tggactgggt gcgacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg ggtgggagtg atctggggcg gaggcggcac ctactacgcc 180
 tcttccctga tgggcccgtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240
 cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag acacgcctac 300
 ggccacgacg gcggcttcgc catggattat tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360
 tccgctagca ccaagggccc aagtgtgttt cccctggccc ccagcagcaa gtctacttcc 420
 ggcggaactg ctgccctggg ttgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg 480
 tcctggaact ctggggctct gacttcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccct ccagctctct gggaaccag 600
 acctatatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagctccaga actgctggga 720
 gggccttccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780
 cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg acccagaggt gaagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagaca agcccagaga ggagcagtag 900
 aacagcacct acagggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
 aaagaataca agtgcaaagt ctccaacaag gccctgccag cccaatcga aaagacaatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgat 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200
 gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
 acccagaagt ccctgagcct gagccccggc aag 1353

<210> 104

<211> 642

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 104

```

gagatcgtga tgacccagtc ccccgccacc ctgtctgtgt ctcccggcga gagagccacc      60
ctgagctgca gaggctccga gtccgtgtcc tccaacgtgg cctggtatca gcagagacct      120
ggtcaggccc ctcggtctgt gatctacggc gcctctaacc gggccaccgg catccctgcc      180
agattctccg gctccggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatctcccg gctggaaccc      240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgcggccag tcctactcat accccttcac cttcggccag      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc      360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtgggtgt gcctgctgaa caacttctac      420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcaagcgg caacagccag      480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc      540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc                          642

```

<210> 105

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 105

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1              5              10              15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20              25              30

```

```

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

```

```

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met

```

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 106

<211> 451

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 106

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 107
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность

<400> 107
 gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtgcagt caggcggtag cctgagactg

60

agctgcgccg cctccggctt tagcctgtct agctacggcg tggactgggt cgcacaggcc	120
cctggcaaag gcctggagtg ggtcggagtg atctggggcg gaggcggaac ctactacgcc	180
tctagcctga tgggccggtt cactatctct agggacaact ctaagaacac cctgtacctg	240
cagatgaact cactgagagc cgaggacacc gccgtctact actgcgctag aaacgcctac	300
ggtcacgacg gcggcttcgc tatggactac tggggtcagg gcaccctggt caccgtgagt	360
tca	363

<210> 108

<211> 1353

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность

<400> 108

gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtgcagt caggcggtag cctgagactg	60
agctgcgccg cctccggctt tagcctgtct agctacggcg tggactgggt cgcacaggcc	120
cctggcaaag gcctggagtg ggtcggagtg atctggggcg gaggcggaac ctactacgcc	180
tctagcctga tgggccggtt cactatctct agggacaact ctaagaacac cctgtacctg	240
cagatgaact cactgagagc cgaggacacc gccgtctact actgcgctag aaacgcctac	300
ggtcacgacg gcggcttcgc tatggactac tggggtcagg gcaccctggt caccgtgagt	360
tcagctagca ctaagggcc aagtgtgttt cccctggccc ccagcagcaa gtctacttcc	420
ggcggaactg ctgccctggg ttgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg	480
tcctggaact ctggggctct gacttccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccct ccagctctct gggaaccag	600
acctatatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag	660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagctccaga actgctggga	720
gggccttccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780
cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tccacgagg acccagaggt gaagttcaac	840
tggtagtggt acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac	900

2017-05-04-06-26-34-186.txt

aacagcacct acaggggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaagaatata agtgcaaagt ctccaacaag gccctgccag ccccaatcga aaagacaatc	1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag	1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgat	1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag ccgagaaca actacaagac cccccccca	1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg	1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac	1320
accagaagt ccctgagcct gagccccggc aag	1353

<210> 109
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 109

Asn	Ala	Tyr	Gly	His	Asp	Gly	Gly	Phe	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5						10		

<210> 110
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<400> 110	
tctggcgag taatacacgg cc	22

<210> 111
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность

<220>
 <221> неопределенный признак
 <222> (1)..(3)
 <223> вырожденная тринуклеотидная последовательность кодона nnk

 <400> 111
 nnkgcctatg gccatgatgg cg 22

 <210> 112
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая последовательность

 <400> 112
 gcctttctct ccacagg 17

 <210> 113
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая последовательность

 <400> 113
 ggcaaacac agatggctgg 20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула, которые связываются с SEQ ID NO:1, и, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит

(a) вариабельную область тяжелой цепи, где:

i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, и

ii) CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27, и

iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:109; и

(b) вариабельную область легкой цепи, где

i) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30 или SEQ ID NO:31, и

ii) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и

iii) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

2. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:16, и где вариабельная область легкой цепи обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:17.

3. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где FR4 тяжелой цепи представляет собой человеческую зародышевую FR4.

4. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.3, где FR4 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO:42.

5. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где FR4 легкой цепи представляет собой человеческую зародышевую FR4.

6. Антитело или фрагмент антитела по п.5, где FR4 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO:50.

7. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22;
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:23;
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29;
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30;
- v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и
- vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

8. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22;
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:24;
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29;
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:31;
- v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и
- vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

9. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22;
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25;
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29;
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30;
- v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и
- vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

10. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22;
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:26;
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29;
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30;
- v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и
- vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

11. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22;
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:27;
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29;
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30;

v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и

vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

12. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где:

i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22;

ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25;

iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:109;

iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30;

v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и

vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

13. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.2, где антитело или фрагмент антитела содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:16, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:17.

14. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где антитело или фрагмент антитела конкурирует с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:16, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:17.

15. Выделенное антитело по п.1, где выделенное антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:99 и SEQ ID NO:105; и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:9.

16. Выделенное антитело по п.15, где выделенное антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула содержит любой из:

i) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:6, и переменного домена легкой цепи, содержащего SEQ ID NO:7;

ii) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:8, и переменного домена легкой цепи, содержащего SEQ ID NO:9;

iii) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID

NO:10, и переменного домена легкой цепи, содержащего SEQ ID NO:7;

iv) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:12, и переменного домена легкой цепи, содержащего SEQ ID NO:7;

v) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:14, и переменного домена легкой цепи, содержащего SEQ ID NO:7;

vi) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:99, и переменного домена легкой цепи, содержащего SEQ ID NO:7; и

vii) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:105, и переменного домена легкой цепи, содержащего SEQ ID NO:7.

17. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где указанные антитело или фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула являются гуманизированными.

18. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, содержащие фрагмент Fab'.

19. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где антитело или фрагмент антитела содержит Fc IgG.

20. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, содержащие одноцепочечное антитело (scFv).

21. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, содержащие человеческую константную область.

22. Выделенное антитело по п.21, где выделенное антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:106; и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:66 или SEQ ID NO:70.

23. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где антитело или фрагмент антитела является перекрестно сшитым с вторым антителом или фрагментом антитела,

где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула представляет собой агонист SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

24. Выделенное антитело или фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула, связывающие SEQ ID NO:1, выбранные из любого из:

A. антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22,
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:23,
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29,
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30,
- v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и
- vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34;

B. антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22,
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:24,
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29,
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:31,
- v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и
- vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34;

C. антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22,
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25,
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29,
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30,
- v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и
- vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34;

D. антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где:

- i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22,
- ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:26,
- iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29,
- iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30,

v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и

vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34;

Е. антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где:

i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22,

ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:27,

iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29,

iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30,

v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и

vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34; и

Ф. антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы, где:

i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22,

ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:25,

iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:109,

iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO:30,

v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, и

vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.

25. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, где указанные антитело или фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула являются гуманизированными.

26. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, содержащие фрагмент Fab'.

27. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, где антитело или фрагмент антитела содержит Fc IgG.

28. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, содержащие одноцепочечное антитело (scFv).

29. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, содержащие человеческую константную область.

30. Выделенное антитело по п.29, где выделенное антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:106; и легкую цепь,

содержащую SEQ ID NO:66 или SEQ ID NO:70.

31. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, где антитело или фрагмент антитела является перекрестно сшитым с вторым антителом или фрагментом антитела, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула является агонистом SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

32. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где антитело или фрагмент антитела является гликозилированным.

33. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.1, где антитело является модифицированным или является экспрессированным в модифицированной клетке, где такая модификация приводит к усиленной эффекторной функции по отношению к FcR антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы.

34. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, где антитело или фрагмент антитела является гликозилированным.

35. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по п.24, где антитело является модифицированным или является экспрессированным в модифицированной клетке, где такая модификация приводит к усиленной эффекторной функции по отношению к FcR антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы.

36. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-35, где антитело или фрагмент антитела индуцирует увеличенное соотношение Тэфф:Трег *in vivo*.

37. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-35, где антитело или фрагмент антитела индуцирует усиленный иммунный ответ *in vivo*.

38. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-31, где антитело обладает перекрестной реактивностью по отношению к GITR не относящегося к человеку примата, и не обладает перекрестной реактивностью по отношению к GITR грызунов.

39. Полинуклеотид, кодирующий антитело, фрагмент антитела,

или антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-35.

40. Композиция, содержащая выделенное антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-35 и фармацевтически приемлемый носитель.

41. Композиция по п.40, дополнительно содержащая связывающую молекулу, нацеленную на опухолеассоциированный антиген, антагонист CTLA4, LAG3 или TIM3, или ингибитор взаимодействия PD-1/PD-L1.

42. Набор, содержащий антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-35.

43. Способ усиления ответа Т-клеток у нуждающегося в этом индивидуума, включающий в себя введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антитела, фрагмента антитела, или антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-35.

44. Способ по п.43, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу вводят совместно с антигеном, антагонистом CTLA4, LAG3 или TIM3, или ингибитором взаимодействия PD-1/PD-L1.

45. Способ по п.43, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу вводят совместно с химиотерапевтическим средством или цитотоксином.

46. Способ по п.43, где ответ Т-клеток представляет собой ответ Т-клеток CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL).

47. Способ по п.43, где индивидуум имеет злокачественную опухоль, экспрессирующую опухолеассоциированный антиген.

48. Способ по п.47, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу вводят совместно с клетками злокачественных опухолей от индивидуума.

49. Способ по п.47, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, колоректального рака, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака молочной железы и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC).

50. Способ по п.43, где ответ Т-клеток представляет собой ответ CD4+ Т-клеток-помощников (Th).

51. Способ лечения роста злокачественной опухоли, экспрессирующей опухолеассоциированный антиген, у нуждающегося в этом индивидуума, включающий в себя введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антитела, фрагмента антитела или антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-35.

52. Способ по п.51, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу вводят совместно с опухолеассоциированным антигеном.

53. Способ по п.51, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу вводят совместно с антагонистом CTLA4, LAG3 или TIM3, или ингибитором взаимодействия PD-1/PD-L1.

54. Способ по п.51, где антитело или фрагмент антитела вводят совместно с химиотерапевтическим средством или цитотоксином.

55. Способ по п.51, где антитело или фрагмент антитела вводят совместно с клетками злокачественных опухолей от индивидуума.

56. Способ по п.51, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, колоректального рака, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), лимфомы, рака молочной железы и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC).

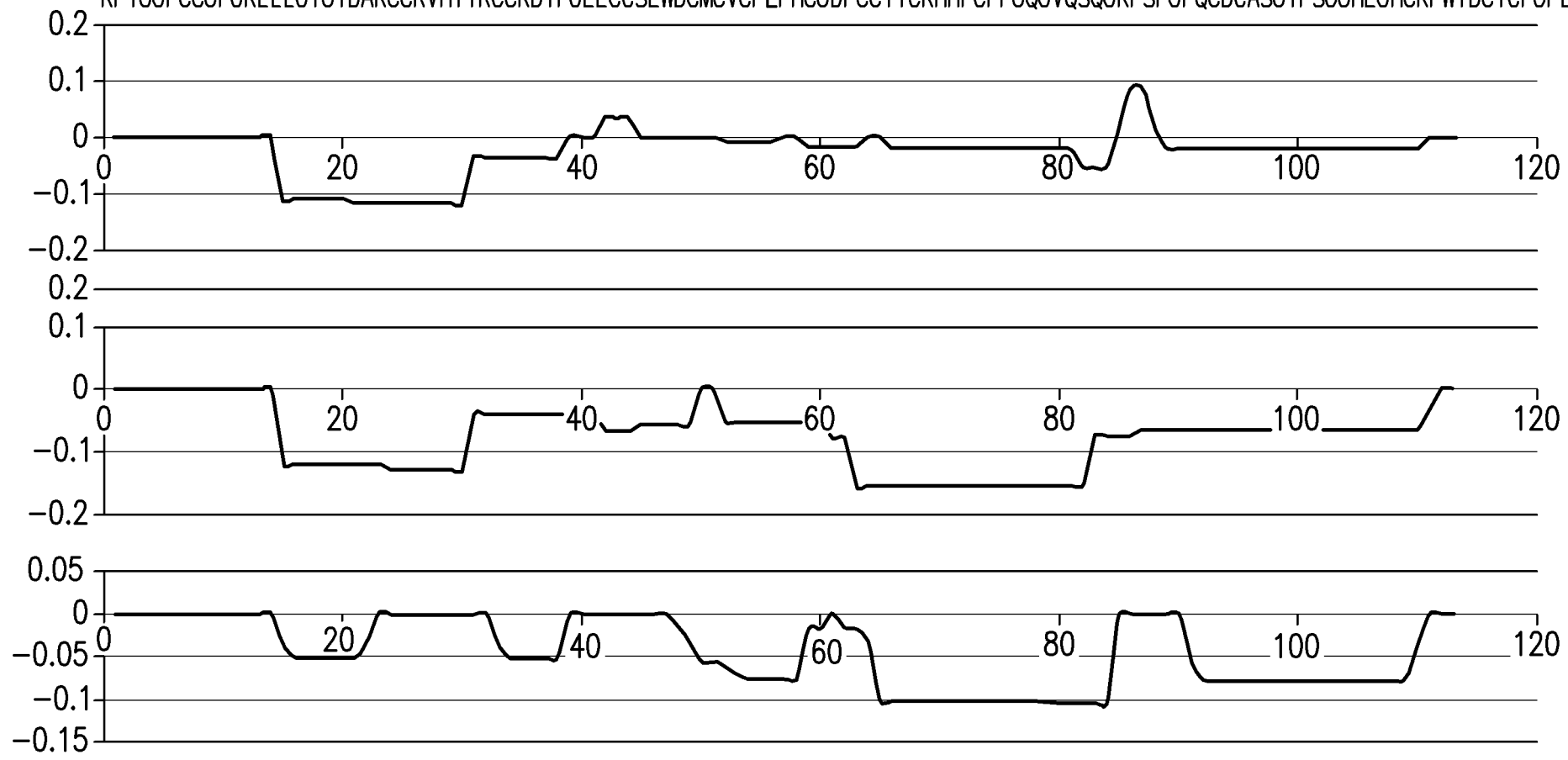
57. Выделенное антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-35 для применения для усиления ответа Т-клеток у нуждающегося в этом индивидуума.

58. Выделенное антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-35 для применения в лечении роста опухоли у нуждающегося в этом индивидуума.

По доверенности



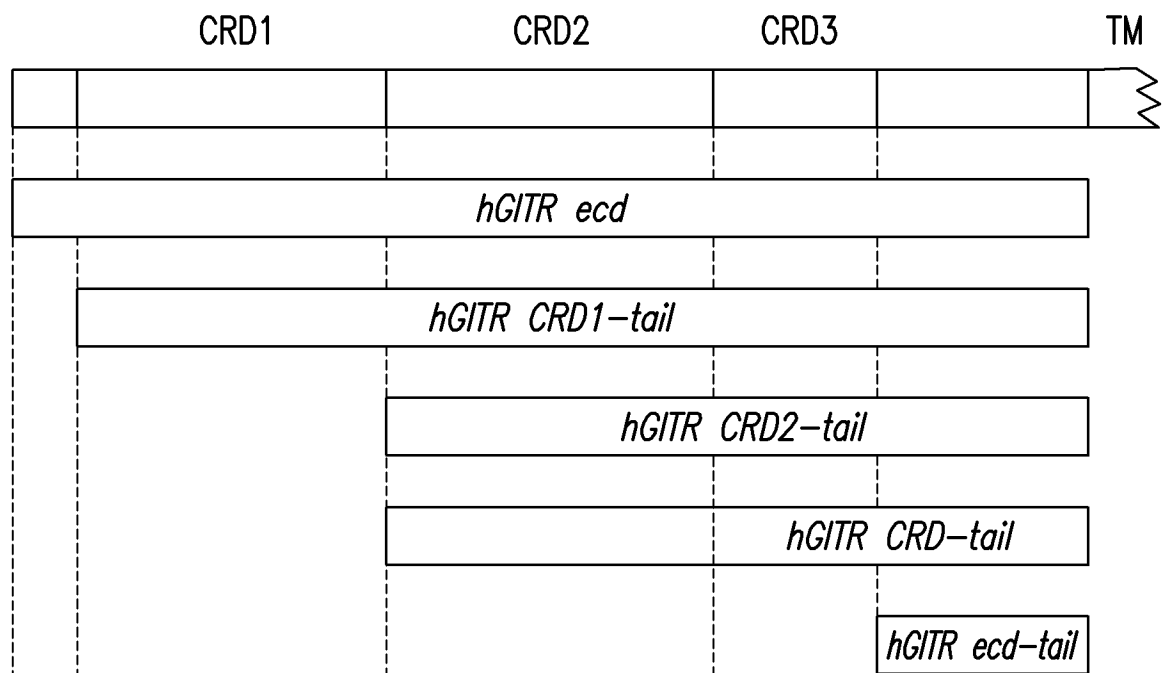
RPTGGPCCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVCPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQKFSFGFQCDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCCTCFGL



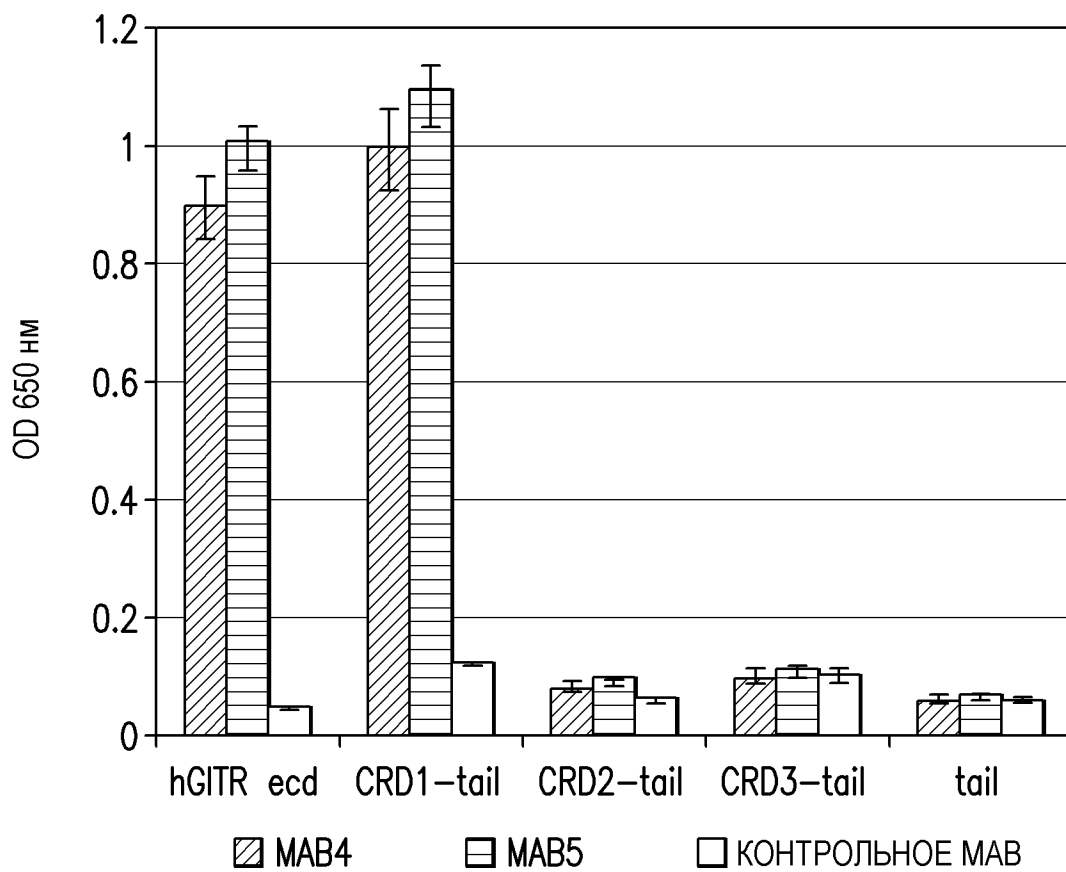
1/14

ФИГ. 1А

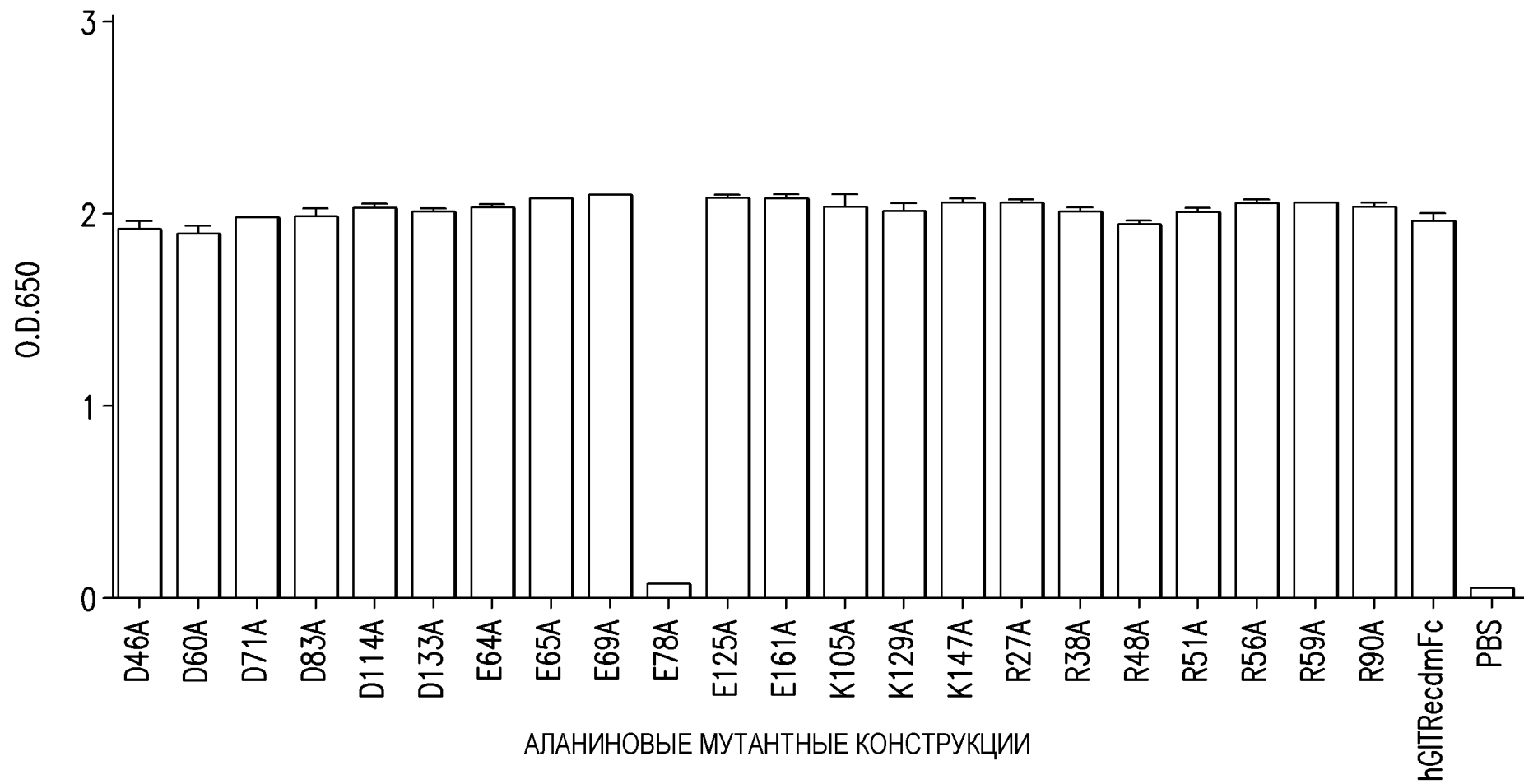
541764



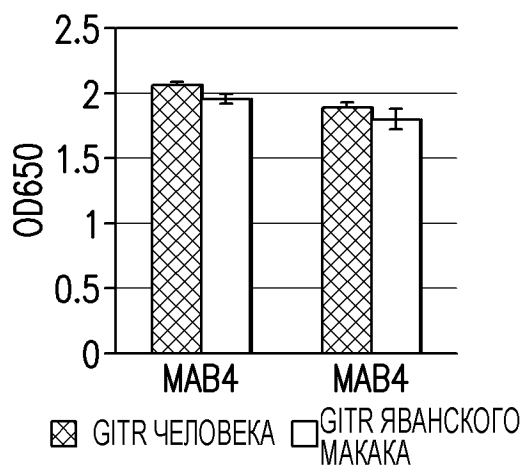
ФИГ. 1В



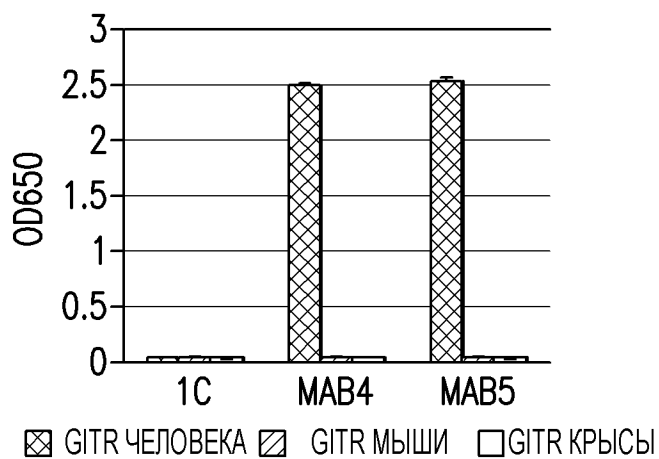
ФИГ. 1С



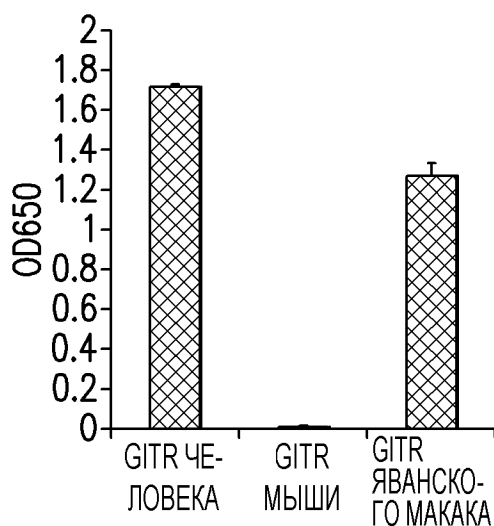
ФИГ. 1D



ФИГ. 2А



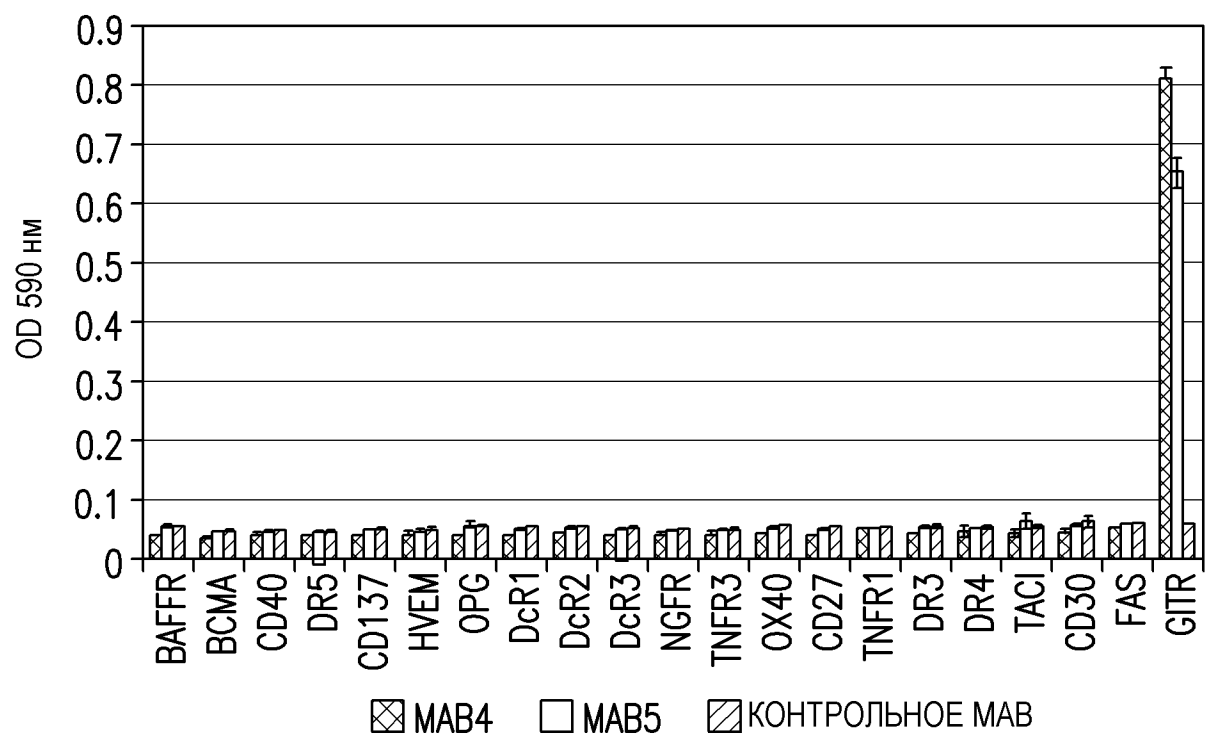
ФИГ. 2В



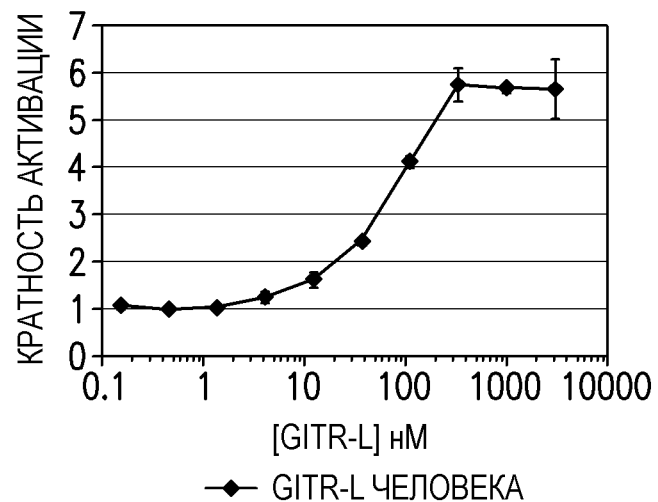
ФИГ. 2С



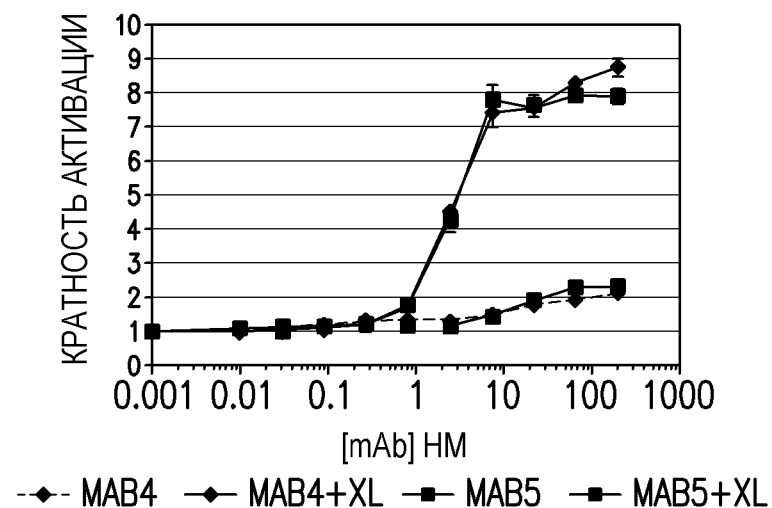
ФИГ. 2D



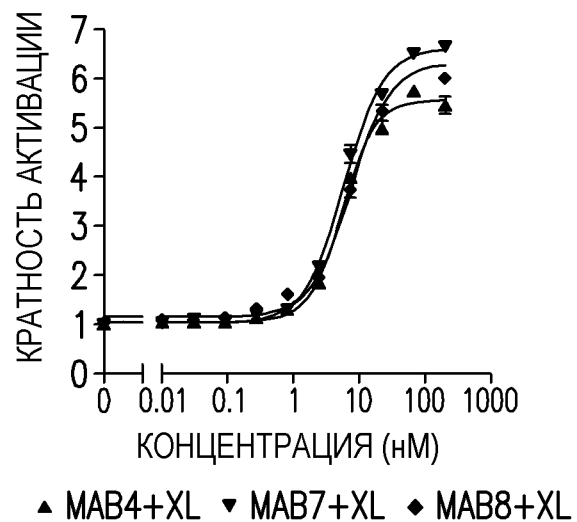
ФИГ. 2Е



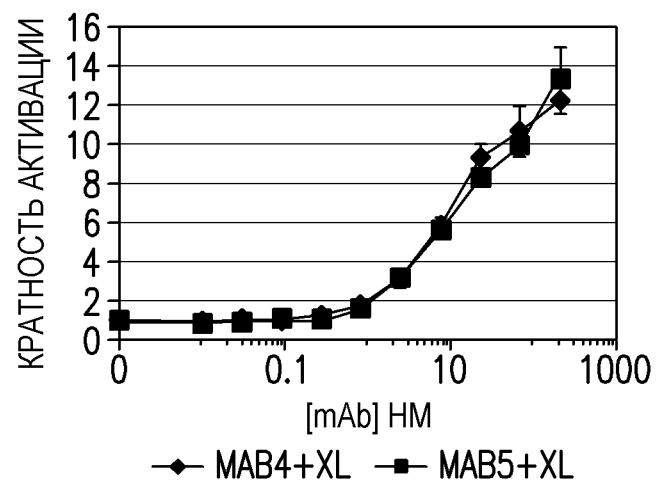
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 3С



ФИГ. 3D



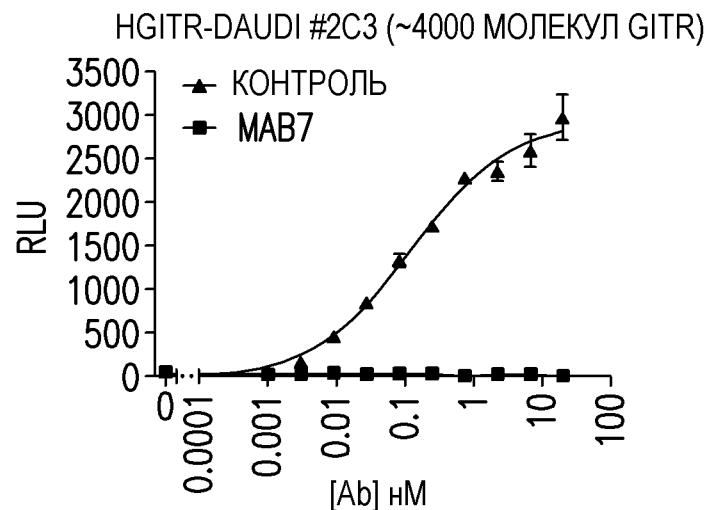
ФИГ. 4А



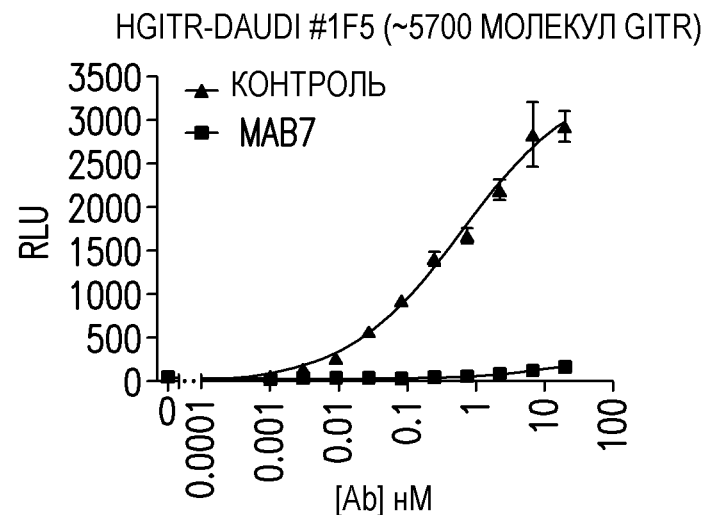
ФИГ. 4В



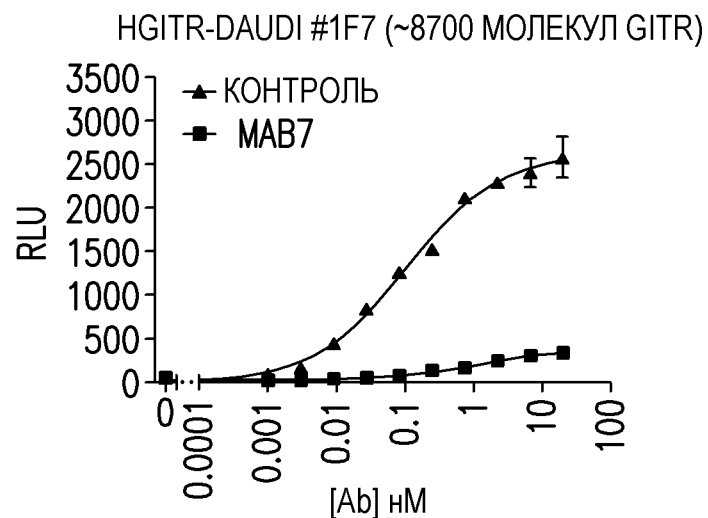
ФИГ. 4С



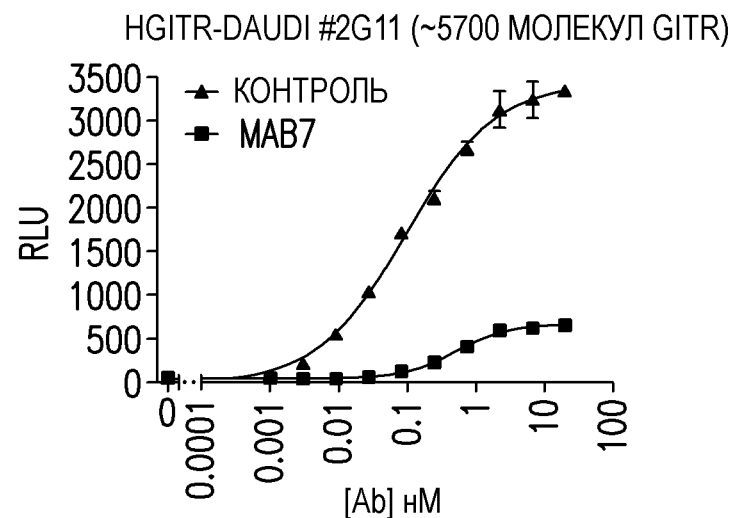
ФИГ. 5А



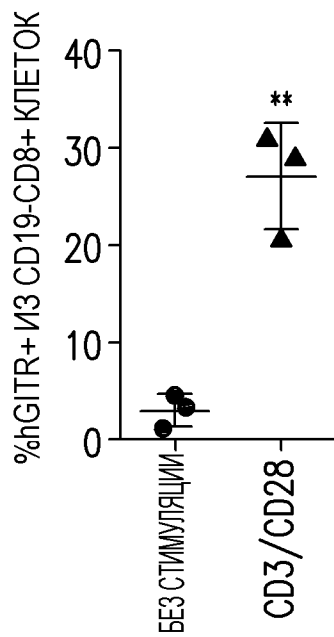
ФИГ. 5В



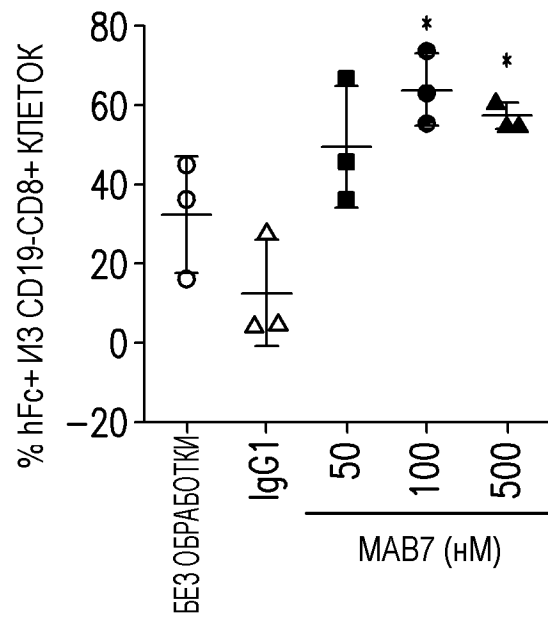
ФИГ. 5С



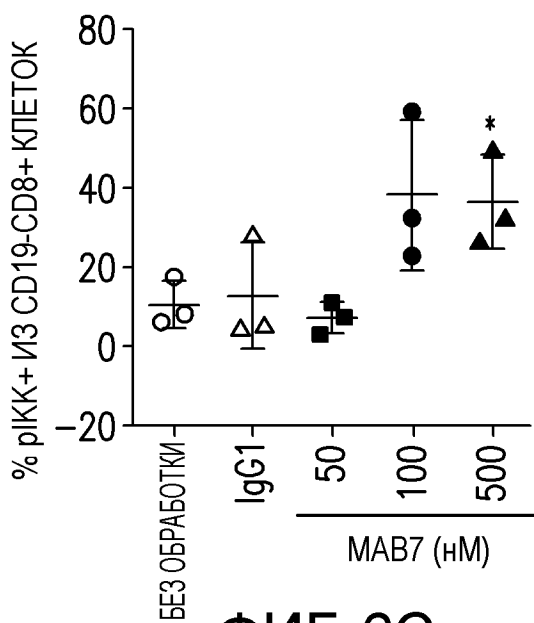
ФИГ. 5D



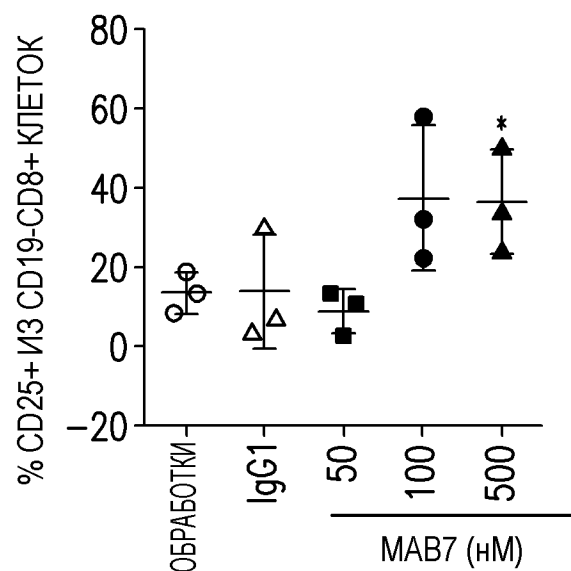
ФИГ. 6А



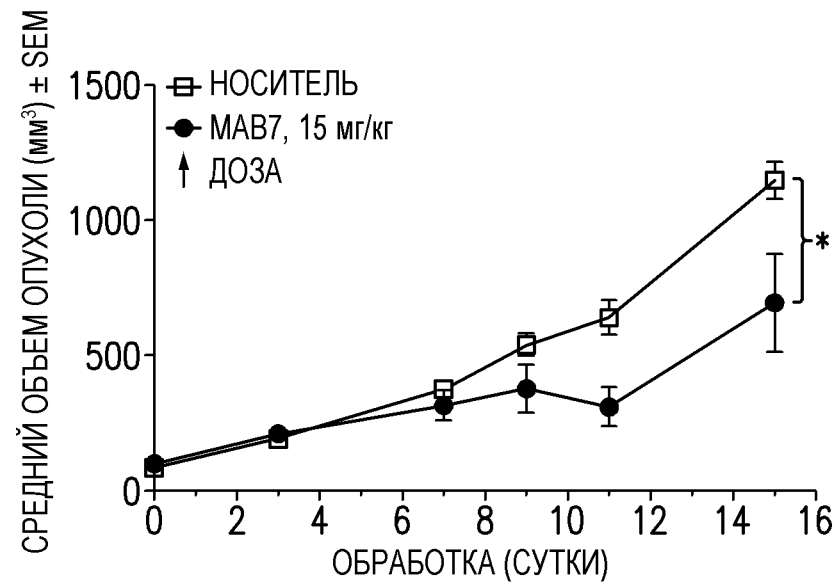
ФИГ. 6В



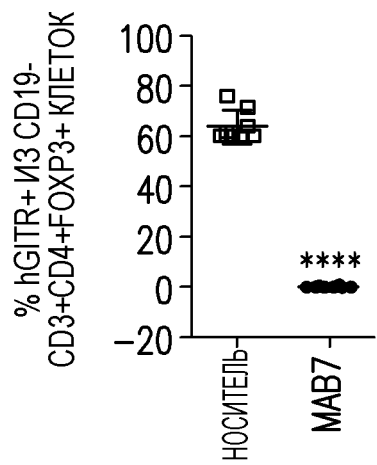
ФИГ. 6С



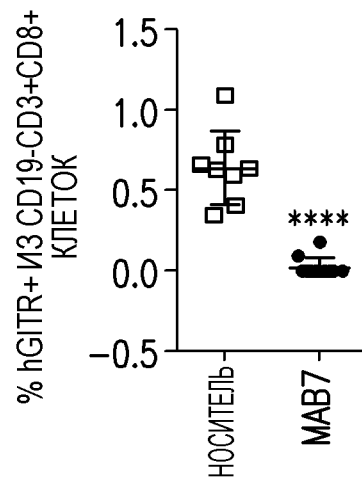
ФИГ. 6D



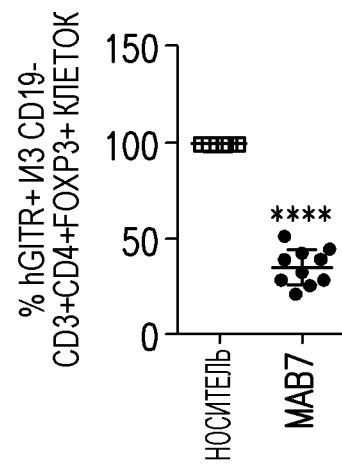
ФИГ. 7А



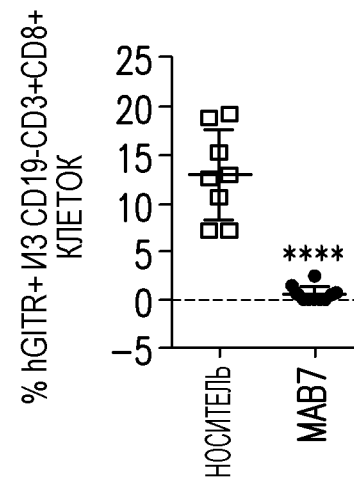
ФИГ. 7В



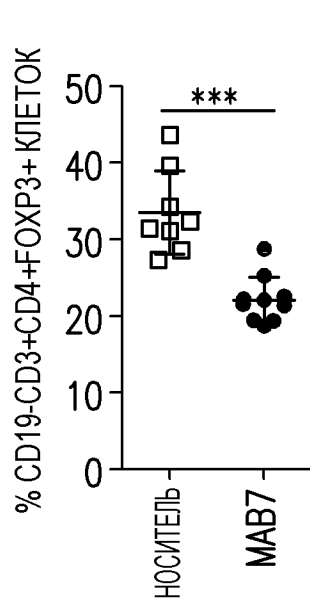
ФИГ. 7С



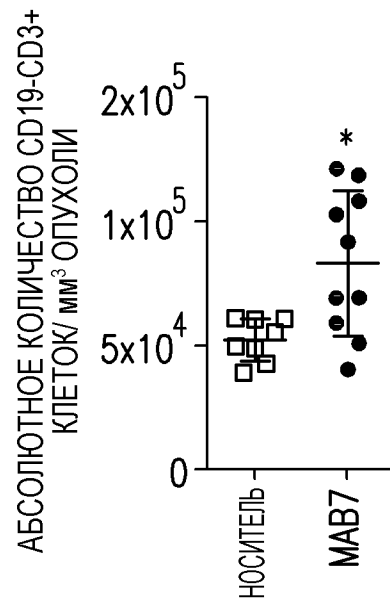
ФИГ. 7D



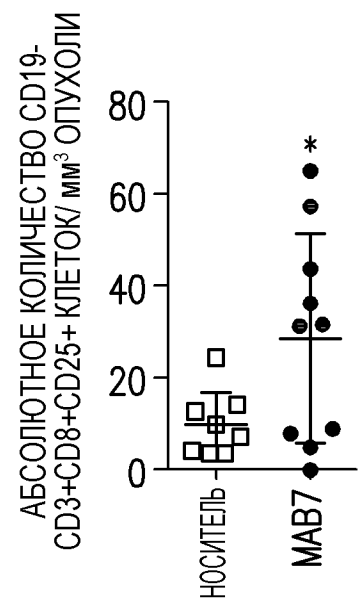
ФИГ. 7Е



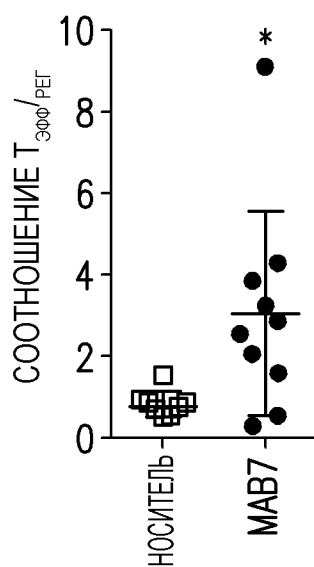
ФИГ. 8А



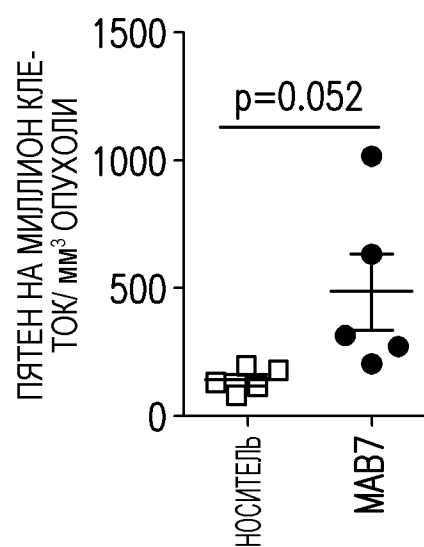
ФИГ. 8В



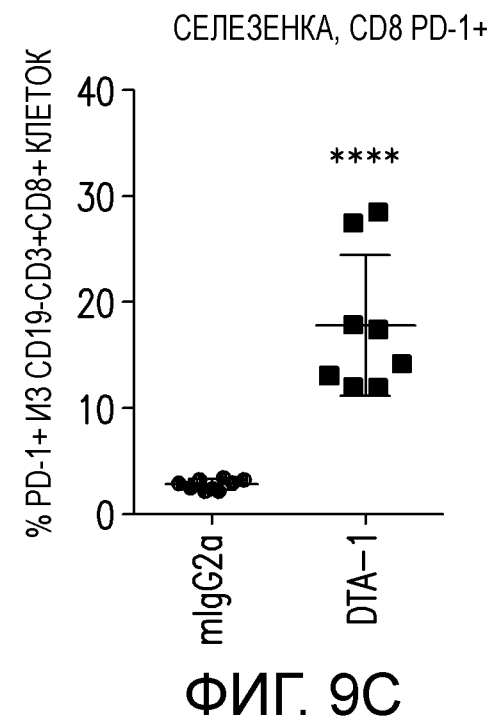
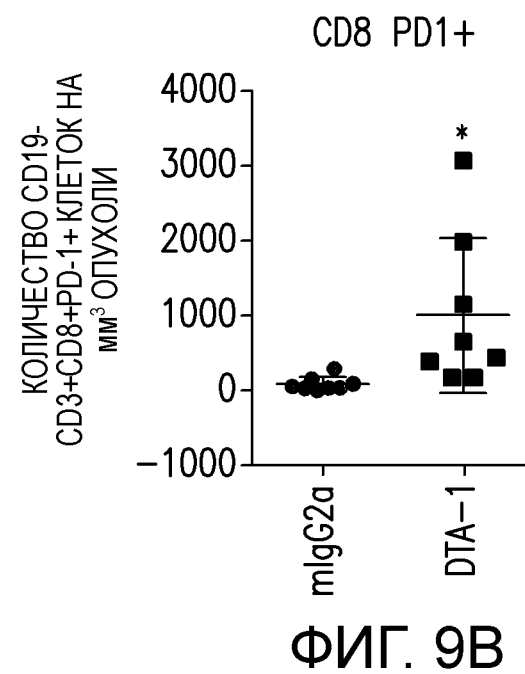
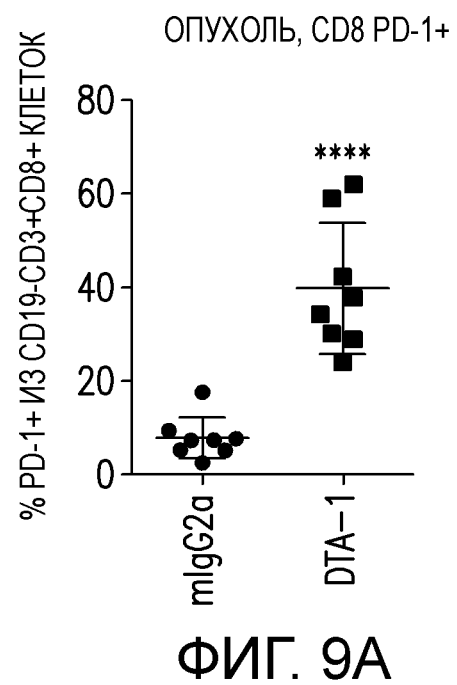
ФИГ. 8С

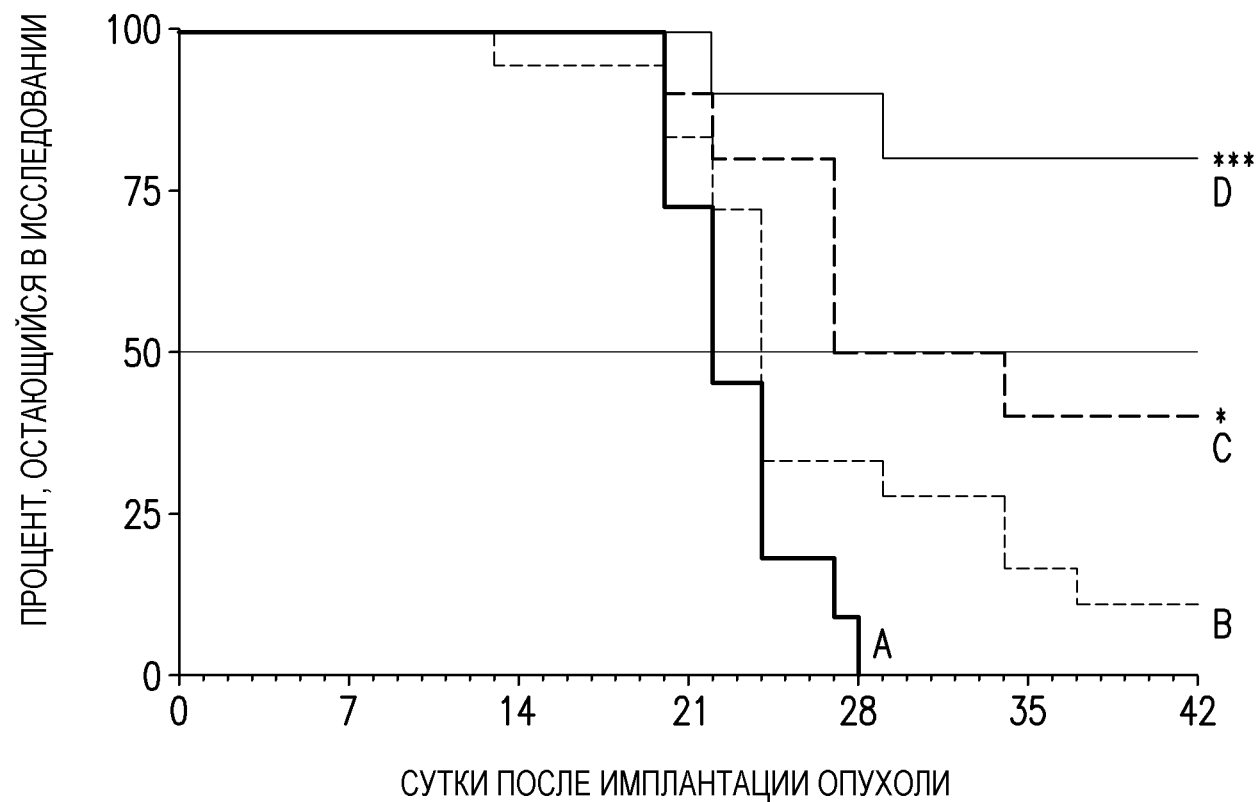


ФИГ. 8D



ФИГ. 8Е





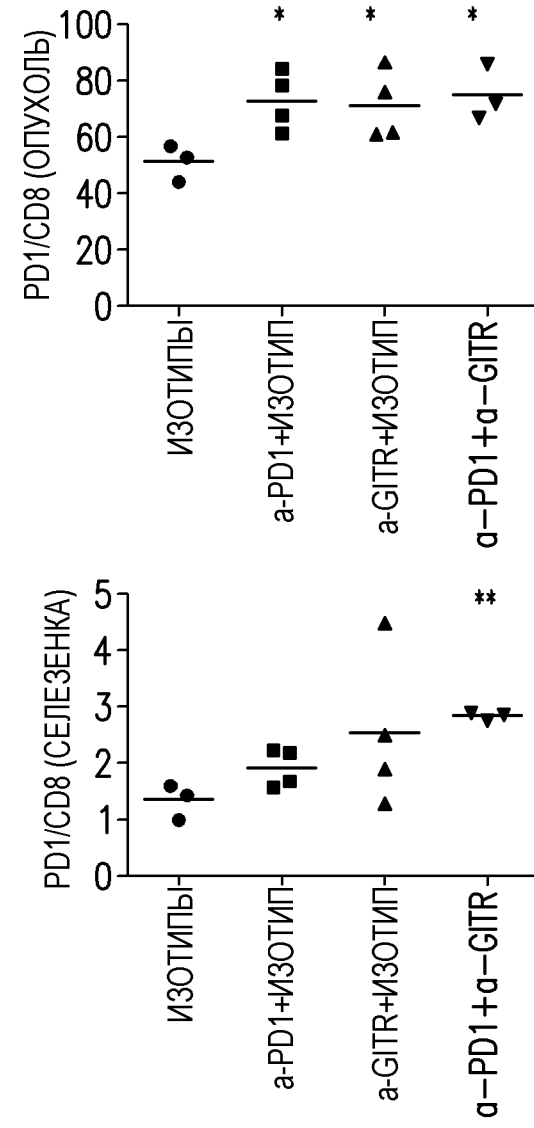
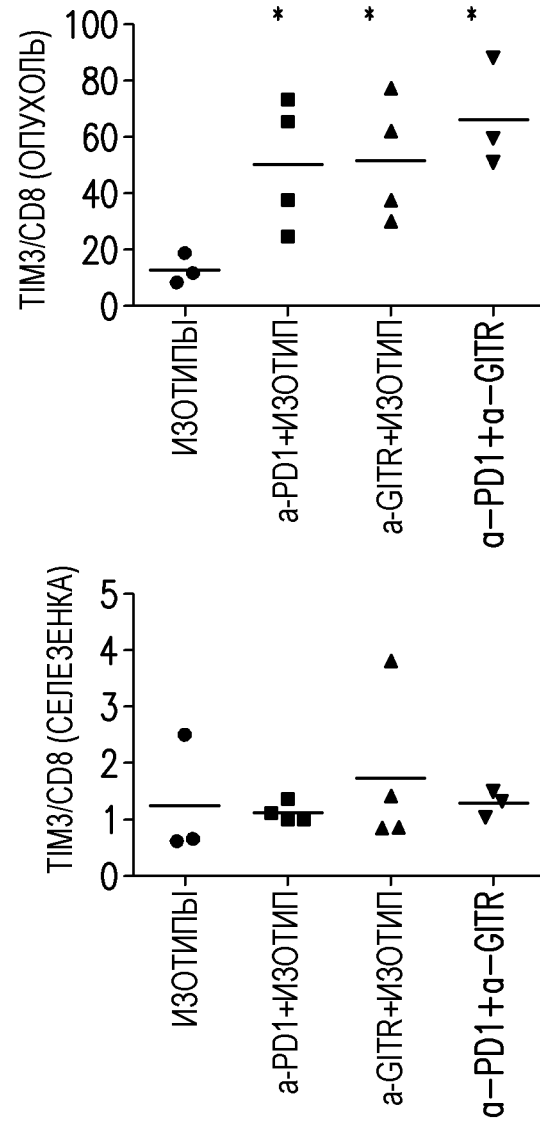
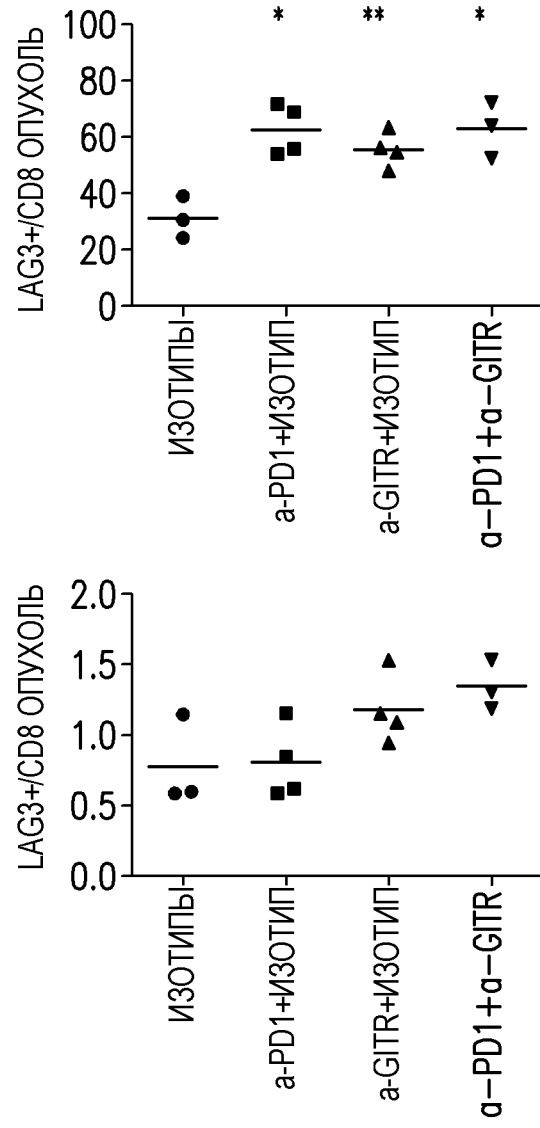
A — КОНТРОЛЬ ИЗОТИПА

B ---- АНТИТЕЛО ПРОТИВ RMP1-14+АНТИТЕЛО ПРОТИВ mIgG2a

C --- АНТИТЕЛО ПРОТИВ DTA-1+АНТИТЕЛО ПРОТИВ rIgG2a

D — АНТИТЕЛО ПРОТИВ DTA-1+АНТИТЕЛО ПРОТИВ RMP1-14

ФИГ. 10



ФИГ. 11