(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.11.13

(21) Номер заявки

201790799

(22) Дата подачи заявки

2015.10.08

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

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
- (43) 2017.08.31
- (86) PCT/US2015/054775
- (87)WO 2016/057846 2016.04.14
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец: НОВАРТИС АГ (СН)
- (72)Изобретатель: Брогдон Дженнифер, Чиполлетта Даниэла, Дранофф Гленн, Ни Дебора А., Ван Фэй (US)
- (74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)

US-A1-2014065152 (56) WO-A1-2013039954 WO-A1-2011028683 WO-A2-2004107618 WO-A2-2006105021

A.D. COHEN ET AL .: "Agonist Anti-GITR Antibody Enhances Vaccine-Induced CD8+ T-Cell Responses and Tumor Immunity", CANCER RESEARCH, vol. 66, no. 9, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 4904-4912, XP055049643, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2813, abstract, p. 4905 left-hand column, last but one full paragraph, p. 4905 right-hand column last full paragraph, p. 4909 left-hand column line 15, Fig. 1-6

"TREATMENT KO ET ADVANCED OF **TUMORS** WITH **ANTI-GITR AGONISTIC** MAB AND **EFFECTS** TUMOR-INFILTRATING ITS ON FOXP3(+)CD25(+)CD4(+) REGULATORY T CELLS", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICÍNE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 202, no. 7, 3 October 2005 (2005-10-03), pages 885-891, XP009076415, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20050940, abstract, p. 886 right-hand column line 8, p. 890 right-hand column first full paragraph, Fig. 1-5

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; а также к фармацевтическим композициям, содержащим такие молекулы, и к способам их применения.

Родственные заявки

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

Область техники, к которой относится изобретение

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

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 трех богатых цистеином доменов (CRD), за ним следует трансмембранный домен (TM) и внутриклеточный домен (ICD).

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 повергаются 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 МАРК и канонические пути NFкВ. Различные члены семейства TRAF вовлечены в качестве промежуточных элементов передачи сигнала ниже GITR (Nocentini et al. (2005), Eur. J. Immunol., 35:1016-1022).

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). Ко 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

Авторы настоящего изобретения идентифицировали антитела, специфически связывающиеся с индуцируемым глюкокортикоидами членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 18 человека ("GITR"), где антитела обладают активностью агониста hGITR in vitro при перекрестном сшивании in vitro и где антитела обеспечивают активность hGITR in vivo и индуцируют повышение соотношения $T_{\rm эфф}$: $T_{\rm per}$ 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 GITR человека. В одном аспекте изобретение относится к выделенным антителам, фрагментам антител и антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связывают GITR человека, где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула связываются с эпитопом, содержаним

богатый цистеином домен 1 ("CRD1", SEQ ID NO: 4: CGPGRLLLGTGTDARCCRV $_{\rm H}$ TTRCCRDYP-GEECCSEWDC) и

богатый цистеином домен 2 ("CRD2", SEQ ID NO: 5: MCVQPEFHCGDPCCTT-CRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQC), и

где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула являются агонистом GITR, и где антитело, фрагмент антитела, или антигенсвязывающая молекула, необязательно, обладают интактной или усиленной эффекторной функцией по отношению к FcR.

В частности, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которые связывают член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей, индуцируемый глюкокортикоидами родственный TNFR белок (GITR), содержащие CDR вариабельной области тяжелой цепи и CDR вариабельной области легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 23 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (b) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 84; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 80; аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 85; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 82 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 83;
- (c) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 24 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 31; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (d) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 84; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 80; аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 86; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 82 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 83;
- (e) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22, аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 25 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34.
- (f) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 26 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (g) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 27; аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (h) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 25 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 109 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34; и
- (i) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 84, аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 80, аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 109 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 85;, аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 82 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержат CDR вариабельной области тяжелой цепи и CDR вариабельной области легкой цепи:

аминокислотную последовательность V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотную последовательность V_HCDR2 SEQ ID NO: 25 и аминокислотную последовательность V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и

аминокислотную последовательность V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотную последовательность V_LCDR3 SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент являются гуманизированными.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержат область Fc антитела изотипа IgG.

По отношению к дополнительным вариантам осуществления антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих молекул, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи обладает по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью из SEQ ID NO: 16, и вариабельная область легкой цепи обладает по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью из SEQ ID NO: 17. В конкретных вариантах осуществления антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула содержат тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержат вариабельный 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 вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEO ID NO: 7 или SEO ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержат

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и $V_{\rm L}$, содержащую

SEQ ID NO: 7;

 V_{H} , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и V_{L} , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

 V_H , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

 V_H , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и $V_{\rm L}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и $V_{\rm L}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; или

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, и $V_{\rm L}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления представлено антитело или его фрагмент, которые содержат V_H , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления представлено антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность 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 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления представлено антитело или его фрагмент, содержащие

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления представлено антитело или его фрагмент по любому из пп.1-11, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления представлено антитело или его фрагмент, перекрестно сшитые со вторым антителом или фрагментом антитела против GITR.

В некоторых вариантах осуществления представлено антитело, которое является гликозилированным.

В следующем аспекте изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его фрагмент по изобретению для усиления ответа Т-клеток и фармацевтически приемлемый носитель.

В следующем аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему антитело или его фрагмент по изобретению.

Изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему антитело или его фрагмент, которые содержат $V_{\rm H}$ с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 101, и $V_{\rm L}$ с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 102.

В следующем аспекте изобретение относится к экспрессирующему вектору, содержащему полинуклеотид по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащему полинуклеотид или экспрессирующий вектор по изобретению.

Изобретение также относится к применению антитела или его фрагмента по изобретению для усиления ответа Т-клеток.

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

В следующем аспекте изобретение относится к способу усиления ответа T-клеток, включающему введение антитела или его фрагмента по изобретению совместно с химиотерапевтическим средством или цитотоксином, в частности, где ответ T-клеток представляет собой ответ T-клеток $CD8^+$ цитотоксических T-лимфоцитов (CTL) или ответ $CD4^+$ T-клеток-помощников (Th).

В еще одном аспекте изобретение относится к применению антитела или его фрагмента по изобретению для лечения карцином у индивидуума, нуждающегося в этом, в частности, где индивидуум имеет колоректальный рак.

Определения

"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 вариабельных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируют как к или λ. Тяжелые цепи классифицируют как у, ц, а. б или є, 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 вариабельную область из приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственных за узнавание антигена. Термины "вариабельная область легкой цепи (V_L) " и "вариабельная 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 (С) область или домен. Секретируемая область иммуноглобулина С состоит из трех доменов C, C_H1, C_H2, C_H3, необязательно, C_H4 (Cµ), и шарнирной области. Связанная с мембраной форма области С 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 $V_{\rm H}$, и $C_{\rm L}$ соединена с первым константным доменом тяжелой цепи. Спаривание $V_{\rm H}$ и $V_{\rm L}$ 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.

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)', в мономер Fab'. Мономер Fab' представляет собой в основном Fab с частью шарнирной области. Paul, Fundamental Immunology, 3^{fd} 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 почо 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 Fv, одноцепочечные антитела (ScFv), Fab, Fab', Fd (домены V_h и C_H 1), dAb (V_h и выделенная CDR) и мультимерные варианты этих фрагментов (например, F(ab'),) с той же самой специфичностью связывания. Фрагменты антител можно включать также в однодоменные антитела, максиантитела, мини-антитела, диатела, триатела. тетратела. vNAR. бис-scFv и другие варианты антителоподобных соединений для обеспечения специфичности связывания и активности, представленных по настоящему изобретению.

Домен "Fab", как применяют в контексте изобретения, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, константную область домена C_H1 , вариабельный 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, V_H - C_H , и домены легкой цепи Fab представляют собой, в порядке от N-конца до C-конца, C_L - V_H , и домены легкой цепи Fab расположены в порядке C_L - V_L . 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.

С-концевая часть тяжелых цепей иммуноглобулинов, содержащая домены C_H2 и C_H3, представляет собой домен "Fc". "Область Fc", как применяют в настоящем документе, относится к константной области антитела, исключая первый домен константной области иммуноглобулина. Гс 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 Су2 и Су3, и шарнирную область между Су1 и Су. Специалисту в данной области понятно, что границы области Fc могут меняться, однако область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как содержащую остатки С226 или Р230 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 C_H2 и C_H3, так же как модификации, модулирующие эффекторную функцию. Области Гс 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, C1q. Нижняя шарнирная область, кодируемая 5'-частью экзона С_Н2, обеспечивает гибкость антитела для связывания с рецепторами

"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, 4^{th} ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

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-caйт 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).

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.

Термины "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).

"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 этом документе 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.

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 молекулумишень), двухвалентными или мультивалентными (т.е. связывать более одной молекулы-мишени).

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, p. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985). Способы получения одноцепочечных антител (патент США № 4946778) можно адаптировать для получения антител против полипептидов по этому изобретению. Также трансгенных мышей или другие организмы, такие как другие млекопитающие, можно использовать для экспрессии приматизитрованных или гуманизированных антител. 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)).

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); Verhoeyen 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 № 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 комплементарность области ("CDR") и, возможно, некоторые остатки каркасной области ("FR") заменены на остатки из аналогичных участков исходных видов (например, антител грызунов) для придания специфичности связывания.

"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 вариабельную область, обладающую отличной или измененной антигенной специфичностью.

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 бифункциональной 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 мини-антитела.

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, мини-антитела 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.

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.

Термин "вариабельная область" или "V-область" взаимозаменяемо относится 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.

Как применяют в настоящем документе, термин "вариабельный сегмент" или "V-сегмент" взаимозаменяемо относится 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.

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

"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); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31 (3):169-217 (1994).

Термин "соответствующая человеческая зародышевая последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность вариабельной области, разделяющую наивысшую определенную идентичность 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 последовательности 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, каркасные и определяющие комплементарность 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.fir/) и V-base (web-сайт vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

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 иммуноанали-

за, антитело или связывающие средства с конкретной специфичностью связывания связываются с конкретным антигеном по меньшей мере в 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).

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 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.

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} М, например, менее приблизительно 10^{-9} или 10^{-10} М, в некоторых вариантах осуществления менее приблизительно 10^{-11} , 10^{-12} или 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или фрагмент антитела связываются с GITR человека с равновесной константой диссоциации (K_D) приблизительно 1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела связываются с GITR человека с K_D менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела связываются с GITR человека с K_D , лежащей в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,0 нМ.

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 вариабельную область тяжелой цепи антитела и по меньшей мере одну вариабельную 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.

Термины "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 NFкВ). Антитело-агонист стимулирует передачу сигнала посредством GITR подобно природному лиганду, GITR-L. Связывание GITR-L с GITR индуцирует активацию NFкВ благодаря деградации IкВ. В некоторых вариантах осуществления антителоагонист 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.

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 ${\rm CD4}^+$ ${\rm CD25}^+$ и на активированных эффекторных ${\rm CD4}^+$ и ${\rm CD8}^+$ Т-клетках

Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности GITR известны и опубликованы как номер доступа в GenBank Accession NM 004195.2 \rightarrow NP 004186.1 (предшественник изоформы 1), SEQ ID NO: 1:

- 1 maqhgamgaf ralcglallc alslgqrptg gpgcgpgrll lgtgtdarcc rvhttrccrd
- 61 ypgeeccsew dcmcvqpefh cgdpccttcr hhpcppgqgv qsqgkfsfgf qcidcasgtf
- 121 sggheghckp wtdctqfgfl tvfpgnkthn avcvpgsppa eplgwltvvl lavaacvlll
- 181 tsaqlglhiw qlrsqcmwpr etqlllevpp stedarscqf peeergersa eekgrlgdlw

241 v;

- NM_148901.1 \rightarrow NP_683699.1 (предшественник изоформы 2), SEQ ID NO:2:
- $\mbox{1 maqhgamgaf ralcglallc alslgqrptg gpgcgpgrll lgtgtdarcc} \label{eq:gpgcgpgrll} \mbox{1 ryhttrccrd}$
- 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 \rightarrow NP_683700.1 (предшественник изоформы 3), SEQ ID NO:3:
- 1 maqhgamgaf ralcglallc alslgqrptg gpgcgpgrll lgtgtdarcc rvhttrccrd
- 61 ypgeeccsew dcmcvqpefh cgdpccttcr hhpcppgqgv qsqgkfsfgf qcidcasgtf
- 121 sggheghckp wtdctqfgfl tvfpgnkthn avcvpgsppa eplgwltvvl lavaacvlll
- 181 tsaqlglhiw qlrktqllle vppstedars cqfpeeerge rsaeekgrlg dlwv.

См. также номер 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 (T_{per}). 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.

"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 NFкB, увеличенной пролиферации, выживаемости, продукции цитокинов (например,

IFN γ , IL-10, IL-13, TNF α) и цитолитической активности активированных эффекторных CD4 $^+$ и CD8 $^+$ T-клеток. Терапевтически, агонизм GITR усиливает противоопухолевые и противовирусные ответы Т-клеток in vivo.

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.

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 (Ваtzer 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)).

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.

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 О-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 модифицидные 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.

Термин "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, по существу к 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 метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для метионина и TGG, который обычно явля

ном для триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид, подразумевают в каждой описанной последовательности.

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.

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);
- 8) цистеин (С), метионин (М) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

"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.

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, вариабельным областям, проиллюстрированным в любой из SEQ ID NO: 6-10, 12, 14, 59 и 61; вариабельным 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.

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 ком-

пьютер, 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.

"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. 2:482c, посредством алгоритма выравнивания гомологии Needleman and Wunsch (1970), J. Mol. Biol. 48:443, способом поиска сходства Рearson 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)).

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, µ Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410 cootветственно. 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 Т при выравнивании со словом такой же длины из базы данных последовательностей. Т обозначает порог количества баллов для соседнего слова (Altschul et al., выше). Эти исходные совпадения соседних слов выполняют роль затравки 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 Х 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 используют по умолчанию длину слова 3, ожидание (E) 10 и матрицу баллов BLOSUM62 (см. Henikoff и Henikoff (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915), количество выравниваний (В) 50, ожидание (Е) 10, М=5, N=-4 и сравнение в двух направлениях.

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.

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 пока-

зателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что одни и те же праймеры можно использовать для амплификации последовательности.

Термин "связь", при применении в контексте того, как антигенсвязывающие области соединены внутри связывающей GITR 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).

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).

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 различимого 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.

Термины "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.

Термин "совместное введение" относится к одновременному присутствию двух действующих веществ в крови индивидуума.

Действующие вещества, которые вводят совместно, можно вводить одновременно или последовательно.

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

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 с-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.

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.

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

Агонистические антитела против GITR.

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.

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, К_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.

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 табл. 1 и 2. 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.

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 табл. 1 и 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.

В некоторых вариантах осуществления соответствующая человеческая зародышевая последовательность для V-сегмента тяжелой цепи представляет собой $V_H 3 3-13/30$:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSV

KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (SEQ ID NO:89).

В одном варианте осуществления последняя аминокислота в SEQ ID NO: 89, лизин ("К"), 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 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 90).

Полноразмерный J-сегмент из человеческой зародышевой JH4 представляет собой YF-DYWGQGTLVTVSS (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; Exp. Clin. Immunogenet. 2001; 18(4):242-54 и Giudicelli, et al., Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1; 33(Database issue):D256-61.

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).

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

```
(\texttt{E}/\texttt{Q}) \, \texttt{VQLVESGGGLVQ} \, (\texttt{P}/\texttt{S}) \, \texttt{GGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEW} \, (\texttt{L}/\texttt{V}) \, \texttt{GVIW}
```

 ${\tt GGGGTYY\,(A/T)\,\,(A/S)\,S\,(L/V)\,M\,(A/G)\,RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA\,(K/R)}$

)(H/N)AYGHDGGFAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:16).

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

 $\verb|EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS| (E/Q) SVSSN (L/V) AWYQQ (K/R) PGQAPRLLIYGAS|$

NRATGIP (D/A) RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKLEIK (SEÇ

В некоторых вариантах осуществления i) CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO: 29) или NAYGHDGGFAMDY (SEQ ID NO: 109) и ii) CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность GQSY-SYPFT (SEQ ID NO: 34) или SYSYPF (SEQ ID NO: 83).

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 GFSLSSY (SEQ ID NO: 84); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VIWGGGGTYY(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 (SEO ID NO: 29) или NAYGHDGGFAMDY (SEO ID NO: 109).

В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты антител по изобретению содержат вариабельную 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 GQSYSYPFT (SEQ ID NO: 34) или SYSYPF (SEQ ID NO: 83).

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 GFSLSSY (SEQ ID NO: 84); CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VIWGGGGTYY(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 вариабельную 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 GQSYSYPFT (SEQ ID NO: 34) или SYSYPF (SEQ ID NO: 83).

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). В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты антител являются гуманизированными.

В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты антител по изобретению 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.

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.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность (E/Q)VQLVESGGGLVQ(P/S)GGSLRLSCAASGFSLS (SEQ ID NO: 37); FR2, содержащую аминокислотную последовательность WVRQAPGKGLEW(L/V)G (SEQ ID NO: 40): FR3. содержащую аминокислотную последовательность RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA(K/R) (SEQ ID NO: 41); и FR4, содержащую аминокислотную последовательность WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS (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.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная 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 вариабельная область легкой цепи содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную 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 GI-PARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 47) и GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (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.

На протяжении их полной длины, вариабельные области антител против GITR по настоящему изобретению, как правило, обладают суммарной идентичностью аминокислотной последовательности вариабельной 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 KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:89

 $(V_{\rm H}3~3-13/30+{\rm CDR}3+{\rm JH4},$ 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 че-

ловеческой 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 Тримеры агонистических антител против GITR по настоящему изобретению

Примеры агонистических антител против GITR по настоящему изобретению		
SEQ ID NO:	Последовательность	
описание		
аминокислотной		
последовательно		
сти или		
полинуклеотида		
(PN)		
61: VH, MAB1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLRSYGVDWVRQPPGKGLEWLGVIW	
	GGGGTNYNSALMAKLSISKDKSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAKHAYGHDG	
	GFAMDYWGQGTSVTVSS	
59: VL, MAB1	NIVMTQSPKSMSMSVGERVTLSCKASENVDTFVSWYQQKPDHSPKLLIYGAS	
	NRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQSYSYPFTFGSGTKL	
	EIK	
60: PN для VH	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC	
MAB1,	TGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGGTTTTCATTAAGGAGCTATGGTGTAGA	
кодирующий SEQ	CTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG	
ID NO: 61 (VH)	GGTGGTGGAGGCACAAATTATAATTCAGCTCTCATGGCCAAACTGAGTATCA	
	GCAAAGACAAGTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAAATGAACAGTCTGCAAAC	
	TGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAAACATGCCTATGGTCACGACGGC	
	GGTTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	
58: PN для VL	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGA	
MAB1,	GGGTCACCTTGAGCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGATACTTTTGTATCCTG	
кодирующий SEQ	GTATCAACAGAAACCAGACCACTCTCCTAAACTACTGATATACGGGGCATCC	
ID NO: 59 (VL)	AACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAG	
	ATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGCAGATTATCA	
	CTGTGGACAGAGTTACAGCTATCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTG	
	GAAATAAAA	
6: VH, MAB2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWVGVIW	
	GGGGTYYASSVMARFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG	
	GFAMDYWGQGTLVTVSS	
7: VL, MAB2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS	
	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL	
	EIK	

036467

65: Тяжелая	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWVGVIW
цепь, МАВ2	GGGGTYYASSVMARFTISRDNSKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
Hells, IEISS	GFAMDYWGOGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
	~
	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: Легкая	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
цепь, МАВ2	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
	GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
	FNRGEC
51: PN для VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGTCCC
MAB2,	TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA
кодирующий SEQ	CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGG
ID NO: 6	GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTGTCATGGCCAGATTCACCATCT
	CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
	TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC
	GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
MAB2,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 7	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAG

67: PN для HC CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGTCCC MAB2,

кодирующий SEQ ID NO: 65

TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTGTCATGGCCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG $\verb|CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAGCAGCAC| \\$ CAGCGGCGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC AGTGCCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACCTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG $\verb|CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC|$ $\verb|CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG|$ GACAAGTCCAGGTGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

036467

68: PN для LC	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
MAB2,	GAGCCACCCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 66	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG
	ACGAGCAGCTGAAGAGCGCCACCGCCAGCGTGTGTGCCTGCTGAACAACTT
	CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC
	 GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA
	GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT
	GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC
	TTCAACAGGGGCGAGTGC
O . 1711 MADO	
8: VH, MAB3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWLGVIW
	GGGGTYYTASLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSS
9: VL, MAB3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS
	NRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIK
69: Тяжелая	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWLGVIW
цепь, МАВЗ	 GGGGTYYTASLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
	GFAMDYWGOGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
70: Легкая	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS
цепь, МАВЗ	NRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
	GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
	FNRGEC
53: PN для VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
1	
MAB3,	TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA
кодирующий SEQ	CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG
ID NO: 8	GGTGGTGGAGGCACATATTATACTGCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT
	CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
	TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC
	GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
54: PN для VL	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA
MAB3,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 9	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAA

71: PN для HC CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGTCCC MAB3,

кодирующий SEQ ID NO: 69

TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA $\tt CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG$ GGTGGTGGAGGCACATATTATACTGCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACCTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGCCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGACAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

036467

·	
72: PN для LC	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA
MAB3,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 70	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG
	ACGAGCAGCTGAAGAGCGCCACCGCCAGCGTGTGTGCCTGCTGAACAACTT
	CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC
	GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGGACTCCACCTACA
	GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT
	GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC
	TTCAACAGGGGCGAGTGC
10: VH, MAB4	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWVGVIW
	GGGGTYYASSLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
/. VL, MAD4	
	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIK
73: Тяжелая	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWVGVIW
цепь, МАВ4	GGGGTYYASSLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: Легкая	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
цепь, МАВ4	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
Tour I mana	
	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
	GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
	FNRGEC
55: PN для VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGGTCCC
MAB4,	TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA
кодирующий SEQ	CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGG
ID NO: 10	GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT
10 10. 10	
	CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
	TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC
	GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
MAB4,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
1	
ID NO: 7	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAG
	I

74: PN для HC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGGTCCC MAB4, кодирующий SEQ

ID NO: 73

TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA GGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAGCAGCAC CAGCGGCGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCT ${\tt TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC}$ AGTGCCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

036467

68: PN для LC	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
MAB4,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 66	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG
	ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT
	CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC
	GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA
	GCCTGAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT
	GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC
	TTCAACAGGGGCGAGTGC
12: VH, MAB5	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWLGVIW
	GGGGTYYTSSLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
	GFAMDYWGOGTLVTVSS
7: VL, MAB5	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
,,	NRATGIPARFSGSGSTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGOSYSYPFTFGOGTKL
	EIK
75: Тяжелая	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWLGVIW
цепь, МАВ5	GGGGTYYTSSLMGRFTISRDNSKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
Home, impo	GFAMDYWGOGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: Легкая	EIVMTOSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYOORPGOAPRLLIYGAS
цепь, МАВ5	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGOSYSYPFTFGOGTKL
dens, mass	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVJHKLQS
	GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
	ENRGEC
56: PN для VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC
56: PN для VH	TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA
·	CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG
кодирующий SEQ	GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT
1D NO: 12	CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
	TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC
F.O. 707	GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
MAB5,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 7	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAG

76: PN для HC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC MAB5,

ID NO: 75

TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA кодирующий SEQ CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG $\verb|CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAGCAGCAC| \\$ ${\tt CAGCGGCGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG}$ CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC AGTGCCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACCTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCACTACAGCACCTACAGGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC $\verb|CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG|$ GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

036467

68: PN для LC	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
1	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
MAB5,	
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 66	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG
	ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCCACCGCCAGCGTGGTGCCTGCTGAACAACTT
	CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC
	 GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA
	 GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT
	GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC
	TTCAACAGGGCGAGTGC
11	
14: VH, MAB6	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWLGVIW
	GGGGTYYTSSLMARFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB6	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIK
77: Тяжелая	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWLGVIW
цепь, МАВ6	 GGGGTYYTSSLMARFTISRDNSKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDG
	GFAMDYWGOGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: Легкая	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
цепь, МАВ6	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
	GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
	FNRGEC
57: PN для VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGGTCCC
MAB6,	TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA
кодирующий SEQ	CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG
ID NO: 14	GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGCCAGATTCACCATCT
	CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
	TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC
	GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCA
52: PN для VL	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
MAB6,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 7	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
-2 /	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAG

MAB6,

кодирующий SEQ ID NO: 77

78: PN для HC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGA CTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGG GGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGCCAGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC ${\tt TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCCTATGGCCATGATGGC}$ GGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAG CAGCGGCGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG $\verb|CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCT|\\$ ${\tt TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC}$ AGTGCCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGCCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGACAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC $\verb|CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG|$ GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAA G

036467

68:PN для LC	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAA
MAB6,	GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTG
кодирующий SEQ	GTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGGCATCC
ID NO: 66	AACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
	ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTA
	CTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTT
	GAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG
	ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT
	CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC
	GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGGACTCCACCTACA
	GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT
	GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC
	TTCAACAGGGGCGAGTGC
99: VH, MAB7	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWVGVIW
	GGGGTYYASSLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB7	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIK
100: Тяжелая	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWVGVIW
цепь, МАВ7	GGGGTYYASSLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: Легкая	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
цепь, МАВ7	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
	GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
	FNRGEC
101: PN для VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGTCCGGCGGCTCTC
MAB7,	TGAGACTGTCTTGCGCTGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCCTCTTACGGCGTGGA
кодирующий SEQ	CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGG
ID NO: 99	GGCGGAGGCGCACCTACTACGCCTCTTCCCTGATGGGCCGGTTCACCATCT
	CCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGC
	CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGCCTACGGCCACGACGGC
	GGCTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCC
102: PN для VL	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA
MAB7,	GAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCCTCCAACGTGGCCTG
кодирующий SEQ	GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT
ID NO: 7	AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG
	ACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA
	CTGCGGCCAGTCCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG
	GAAATCAAG

103: PN для HC GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGTCCGGCGGCTCTC MAB7,

ID NO: 100

TGAGACTGTCTTGCGCTGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCCTCTTACGGCGTGGA GGCGGAGGCGCACCTACTACGCCTCTTCCCTGATGGGCCGGTTCACCATCT CCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGC CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGCCTACGGCCACGACGGC GGCTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCCG CTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTAC TTCCGGCGGAACTGCTCGCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAA G

036467

104: PN для LC	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGGCGACCCTGTCTGTGTCTCCCCGGCGAGA
MAB7,	GAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCCTCCAACGTGGCCTG
кодирующий SEQ	GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT
ID NO: 66	AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG
	ACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA
	CTGCGGCCAGTCCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG
	GAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG
	ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT
	CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC
	GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA
	GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT
	GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC
	TTCAACAGGGGCGAGTGC
105: VH, MAB8	EVOLVESGGGLVOSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVROAPGKGLEWVGVIW
, ,	GGGGTYYASSLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSS
7: VL, MAB8	EIVMTOSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYOORPGOAPRLLIYGAS
/: VL, MADO	
	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIK
106: Тяжелая	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSSYGVDWVRQAPGKGLEWVGVIW
цепь, МАВ8	GGGGTYYASSLMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNAYGHDG
	GFAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: Легкая	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
цепь, МАВ8	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSYPFTFGQGTKL
	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
	GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
	FNRGEC
107: PN для VH	GAGGTGCAGCTGGTAGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGTCAGGCGGTAGCC
MAB8,	TGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCTTTAGCCTGTCTAGCTACGGCGTGGA
кодирующий SEQ	CTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGTCGGAGTGATCTGG
ID NO: 105	GGCGGAGGCGGAACCTACTACGCCTCTAGCCTGATGGGCCGGTTCACTATCT
	CTAGGGACAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCACTGAGAGC
	CGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAAACGCCTACGGTCACGACGGC
	GGCTTCGCTATGGACTACTGCGTCAGGGCACCCTGGTCACCGTCACGTCA
100. 507 - 7	
102: PN для VL	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA
MAB8,	GAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCCTCCAACGTGGCCTG
кодирующий SEQ	GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT
ID NO: 7	AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG
	ACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA
	CTGCGGCCAGTCCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG
	GAAATCAAG

108: PN для GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGTCAGGCGGTAGCC MAB8, TGAGACTGAGCTGCGCCCCCCGGCTTTAGCCTGTCTAGCTACGGCGTGGA кодирующий SEO CTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGTCGGAGTGATCTGG ID NO: 106 GGCGGAGGCGGACCTACTACGCCTCTAGCCTGATGGGCCGGTTCACTATCT CTAGGGACAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCACTGAGAGC CGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAAACGCCTACGGTCACGACGGC GGCTTCGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCTGGTCACCGTGAGTTCAG CTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTAC TTCCGGCGGAACTGCTGCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC ACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGACCACCGCCGAGAACAACTACAAGACCACCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGCCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCGGCAA PN для GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCCGGCGAGA 104: LC MAB8. GAGCCACCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCCTCCAACGTGGCCTG колирующий GTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCT SEO ID NO: 66 AACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCGGCCAGTCCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC

CDR антител, перечисленных в табл. 1, можно определять посредством хорошо известных систем нумерации, известны в данной области, включая системы, описанные в настоящем документе. В табл. 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 no	Kabat и Chothia SEQ ID NO: CDR по Chothia
		(Al-Laikani et al., 1997)
	1991)	
MAB1 CDRH1	22: SYGVD	79: GFSLRSY
MAB1 CDRH2	62: VIWGGGGTNYNSALMA	80: WGGGG
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: VIWGGGGTYYASSVMA	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: VIWGGGGTYYTASLMG	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: VIWGGGGTYYASSLMG	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: VIWGGGGTYYTSSLMG	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: VIWGGGGTYYTSSLMA	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

MAB7 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB7 CDRH2	25: VIWGGGGTYYASSLMG	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: VIWGGGGTYYASSLMG	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

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: 30, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 34;
- іі) 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: 31, CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 34;
- ііі) 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: 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 SEO ID NO: 33, и CDR3 легкой цепи содержит SEO 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: 39, 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: 30, CDR2 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 индуцируют увеличенное соотношение $T_{эф}$: T_{per} 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.

В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты антител против GITR по изобретению содержат вариабельную 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.

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.

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.

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.

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: 12, 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.

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: 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 вариабельной областью легкой цепи из SEQ ID NO: 7.

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: 99, 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.

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: 105, 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.

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.

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/kappa 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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKĎYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**LL**GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT 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

 $\verb|RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS||$

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:21).

В некоторых вариантах осуществления аминокислоты внутри константных областей добавлены, делетированы или заменены.

В некоторых вариантах осуществления такое антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. Последовательности V_I, V_L, 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 V_H из конкретной пары V_H/V_L следует заменять на структурно сходную последовательность V_н. 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 V_L из конкретной пары V_H/V_L следует заменять на структурно сходную последовательность V_I. 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.

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.

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.

Антитела и фрагменты антител против GITR по настоящему изобретению, как правило, связывают GITR, включая изоформу 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} или 10^{-9} М, например, или менее приблизительно 10^{-10} или 10^{-11} М и в некоторых вариантах осуществления менее приблизительно 10^{-12} или 10^{-13} М.

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом.

Настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител, которые связываются ("CRD1". SEO эпитопом. содержашим богатый цистеином домен 1 CGPGRLLLGTGTDARCCRV_HTTRCCRDYPGEECCSEWDC) и богатый цистеином домен 2 ("CRD2", SEQ ID NO: 5: MCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQC) из GITR человека, и где антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула представляю 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 связываются 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.

Настоящее изобретение также относится к антителам и фрагментам антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и связывающие GITR антитела, описанные в табл. 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.

Антитело или фрагмент антитела по изобретению, кроме того, можно получать с использованием антитела, обладающего одной или несколькими из последовательностей CDR и/или V_H , и/или V_L , показанных в настоящем документе (например, табл. 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 вариабельных областей (т.е. V_H и/или V_L), 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(ей), например, для изменения эффекторной функции(й) антитела.

Одним из типов конструирования вариабельной 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 цепей (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 № 5225539 от Winter и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 от Queen et al.).

Соответственно, другой вариант осуществления изобретения относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1, обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEO 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 вариабельную 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 V_H и V_L 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.

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 вариабельной области человеческих тяжелых и легких цепей можно обнаружить в базе данных человеческих зародышевых последовательностей "VBase" (доступной в Internet на www.mrc-cpe.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.

Примерами каркасных последовательностей для применения в антителах по изобретению являются последовательности, структурно сходные с каркасными последовательностями, используемыми в из-

бранных антителах по изобретению, например консенсусные последовательности и/или каркасные последовательности, используемые в моноклональных антителах по изобретению. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_L, и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L, 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 № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 от Queen et al).

Другим типом модификации вариабельной области является мутагенез аминокислотных остатков внутри областей CDR1, CDR2 и/или CDR3 $V_{\rm H}$ и/или $V_{\rm L}$, 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(й), 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.

Сконструированные антитела или фрагменты антител по изобретению включают в себя те, в которых модификации выполнены в каркасных остатках внутри $V_{\rm H}$ и/или $V_{\rm L}$, 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.

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 № 20030153043 от Carr et al.

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.

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.

В одном варианте осуществления шарнирная область C_H1 является модифицированной, так что количество остатков цистеина в шарнирной области изменено, например увеличено или уменьшено. Этот способ дополнительно описан в патенте США № 5677425 от Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирной области C_H1 можно изменять, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела или фрагмента антитела.

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 C_H2 - C_H3 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 № 6165745 от Ward et al.

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 № 6277375 от Ward. Альтернативно, для увеличения биологического времени полужизни антитело можно изменять внутри области C_H1 или C_L , чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора спасения, полученный из двух петель домена C_H2 области Fc IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 от Presta et al.

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 № 5624821 и 5648260, оба от Winter et al.

В другом варианте осуществления одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменять на другой аминокислотный остаток, так чтобы антитело обладало измененным связыванием С1q и/или уменьшенной или утраченной комплементзависимой цитотоксичностью (СDС). Этот способ более подробно описан в патенте США № 6194551 от Idusogie et al.

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.

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.

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, FcγRII и FcRn и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R.L. et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

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 № 5714350 и 6350861 от Co et al.

Дополнительно или альтернативно, можно получать антитело, обладающее 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 РСТ WO 03/035835 от Presta описан вариант линии клеток CHO, клетки Lecl3 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 РСТ WO 99/54342 от Umana et al. описаны линии клеток, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета-(1,4)-Nацетилглюкозаминилтрансферазы 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.

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 пять 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.

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).

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 такие 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, вариабельной 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 іп vitro, сходном с процессом аффинного созревания антител іп 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.

Способ анкиринов основан на использовании белков с происходящими из анкирина модулями повторов в качестве остовов, чтобы нести вариабельные 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 вариабельных областей оптимизируют главным образом с использованием рибосомного дисплея.

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 антигенмишень, с использованием способа, описанного, например, в публикациях патентных заявок США № 20040175756; 20050053973; 20050048512 и 20060008844.

Аффинные лиганды аффитела представляют собой небольшие, простые белки, состоящие из трехспирального пучка, основанные на остове одного из связывающих IgG доменов белка А. Белок А представляет собой поверхностный белок из бактерии Staphylococcus aureus. Этот домен остова 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.

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 (ВВР) из Pieris Вгаssiсае, использовали для разработки антикалинов посредством мутагенеза группы из четырех петель. Одним из примеров патентных заявок, описывающих антикалины, является публикация РСТ № WO 1999/16873.

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 рН и денатурирующим агентам. Эта высокая стабильность в основном обусловлена расширенной структурой бета-складки этих белков. Примеры происходящих из гамма-кристаллина белков описаны в WO 2001/04144, и примеры "подобных убиквитину" белков описаны в WO 2004/106368.

Миметики белковых эпитопов (PEM) 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.

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.

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 № 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.

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 № 2005/0255552 и публикацию патента США № 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 вариабельной 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 № 2007/0020685. Положительные клоны можно подвергать дальнейшей характеризации 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.

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 со-

держать 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 № 2005/025552). 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 № 2006/0134098).

В каждом случае спаренные сегменты CDR3 тяжелой и легкой цепей, сегменты CDR3-FR4 или Ј-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.

Белки антитела, полученные из членов семейства верблюда и дромадера (Camelus bactrianus и Calelus 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. PCT/EP93/02214 (WO 94/04678, опубликованную 3 марта 1994 г.).

Область антитела верблюдовых, представляющую собой небольшой одиночный вариабельный домен, обозначенную как V_H H, 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 № 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.

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.

Низкая молекулярная масса и компактный размер дополнительно приводят к тому, что наноантитела верблюдовых являются исключительно термостабильными, стабильными к экстремальному рН 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.

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 мин до 2 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.

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.

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 № 4946778.

Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифические молекулы, в которых домены V_H и V_L экспрессированы на одной полипептидной цепи, соединенные линкером, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи. Домены V_H и V_L 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 V_HA-V_LB и V_HB-V_LA (конфигурация V_H-V_L), либо V_LA-V_HB и V_LB-V_HA (конфигурация V_L-V_H) 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).

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

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-Sацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дитио-би-с(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеинимид N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) И сульфосукцинимидил-4-(Nмалеимидометил)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).

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.

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×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')₂ или лиганд×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 связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патентах США № 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

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 меченого реагента (например, антитела), специфического для представляющего интерес комплекса.

Антитела с увеличенным временем полужизни.

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

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 дентритными клетками). Множество способов можно использовать для продления времени полужизни антител по настоящему изобретению, например, посредством химического связывания с полиэтиленгликолем (ПЭГ), геСОDЕ ПЭГ, остовом антитела, полисиаловой кислотой (PSA), гидроксиэтилкрахмалом (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 антикалины; посредством генетического слияния с г-ПЭГ, альбумином, доменом альбумина, альбуминсвязывающими белками и Fc или посредством включения в наноносители, составы с замедленным высвобождением или медицинские устройства.

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 коньюгации 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 $(C_1$ - $C_{10})$ алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликольмалеинимид. В конкретных вариантах осуществления антитело, подлежащее пэгилированию, представляет собой агликозилированое 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 0154316 от Nishimura et al. и EP 0401384 от Ishikawa et al.

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.

Рекомбинантный способ пэгилирования (рПЭГ) 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.

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

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 коньюгатов ГЭК-антитело по индивидуальному заказу.

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 № WO 98/23289; международную публикацию № WO 97/34 631 и патент США № 6277375.

Кроме того, антитела можно конъюгировать с альбумином для получения антитела или фрагмента антитела, которые являются более стабильными in vivo или обладают более длительным временем полу-

жизни in vivo. Эти способы хорошо известны в данной области, см., например, международные публикации № WO 93/15199, WO 93/15200 и WO 01/77137 и европейский патент № EP 413622.

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.

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 по меньшей мере из 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 V_H , CDR V_H , домен V_L или CDR V_L), 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 № 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851, и 5112946; европейские патенты № EP 307434 и EP 367166; международные публикации № 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.

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 № 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.

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 (НННННН 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 ("HA") метку, соответствующую эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., 1984, Cell, 37:767), и метку "flag".

В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению или их фрагменты коньюгируют с диагностическим или поддающимся детекции средством. Такие антитела можно использовать для мониторирования 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, бетагалактозидаза 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, люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как, но без ограничения, йод (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 Ti), 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, 63 Zn, 85 Sr, 32 P, 153 Gd, 169 Yb, 51 Cr, 54 Mn, 75 Se, 113 Sn и 117 Tin; и позитронно-активные металлы, используемые в различных позитронно-эмиссионных томографах, и ионы нерадиоактивного парамагнитного металла.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к антителу или его фрагменту, конъюгированному с терапевтической группой или группой лекарственного средства, модифицирующими 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 рseudomonas, 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 альфаизлучения. Цитотоксин или цитотоксическое средство включает в себя любое средство, оказывающее неблагоприятное воздействие на клетки.

Например, антитело можно коньюгировать с терапевтическими группами, такими как ион радиоактивного металла, такой как источники альфа-излучения, такие как ²¹³Ві или макроциклические хелаторы, которые можно использовать для коньюгации иона радиоактивного металла, включая, но без ограничения, ¹³¹In, ¹³¹LU, ¹³¹Y, ¹³¹Ho, ¹³¹Sm, с полипептидами. В конкретных вариантах осуществления макроциклический хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',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 GGGGSGGGGGGGGGG (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.

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.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), p. 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.), p. 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.), p. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

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.

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.

Изобретение, кроме того, относится к полинуклеотидам, кодирующим антитела, описанные в настоящем документе, например полинуклеотидам, кодирующим вариабельные области или сегменты тяжелых или легких цепей, содержащие определяющие комплементарность области, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий вариабельные 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 вариабельные 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.

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.

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.

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.

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 SEO ID NO: 68.

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.

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.

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.

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.

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.

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 Веаисаge et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981; и способ на твердой подложке из патента США № 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 µ Eckert et al., PCR Methods and Applications, 1:17, 1991.

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 моно 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, pEBV_His 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.

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 металлотионеина 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 клеткамихозяевами. 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 инициирующий кодон АТG 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.

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 вариабельные домены легкой и тяжелой цепей антитела против GITR, иногда кодируют также константные области или их части. Такие векторы позволяют экспрессию вариабельных 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.

Клетки-хозяева для переноса и экспрессии цепей антител против GITR могут являться либо прокариотическими, либо эукариотическими. Е.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.

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 им-

муноглобулинов (например, клоны гибридомы миеломы, как описано в примерах), либо линию клеток млекопитающих, несущих экзогенный экспрессирующий вектор (например, клетки миеломы SP2/0, проиллюстрированные ниже). Они включает в себя любые нормальные смертные или нормальные или аномальные иммортализованные клетки животных или человека. Например, разработан ряд пригодных линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии клеток СНО, различные линии клеток Соѕ, клетки НеLа, 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 металлотионеина, 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.

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.

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.

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.

Внутриклеточную передачу сигнала посредством GITR можно измерять с использованием любого способа, известного в данной области. Например, активация посредством GITR стимулирует передачу сигнала посредством NFкВ и MAPK. Способы измерения активации NFкВ и MAPK являются стандартными в данной области (например, использование анализов репортерных генов, ядерной транслокации белков посредством NFкВ, 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⁺ T-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-у, 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.

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 T-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.

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.

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.

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.

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).

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, исполь-

зуемым 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 преимущественным 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 предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для оказания желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

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.

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.

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.

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 II (HIV II) 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 мартышковых (В-вируса) и поксвирусов.

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.

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 (hCGB) 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; СА125, 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 СТL 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.

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.

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 ${\rm CD4}^+\ {\rm CD25}^+$ регуляторными Т-клетками (${\rm T}_{\rm per}$) и уменьшают их количество или истощают их. Иллюстративные истощающие ${\rm T}_{\rm per}$ 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.

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 со-

вместно 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 В7-Н1. 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 ТІМ3. 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.

В одном варианте осуществления агонист GITR используют в комбинации с ингибитором PD-1, например, как описано в WO 2015/026684. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело против PD-1, выбранное из ниволумаба, пембролизумаба или пидилизумаба.

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 perистрационный 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 WO 2006/121168. 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).

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб (обозначаемый также как ламбролизумаб, МК-3475, МК03475, 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 WO 2009/114335.

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).

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 WO 2009/101611. 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.

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 WO 2010/027827 и WO 2011/066342), представляет собой слитый растворимый рецептор из PD-L2 и Fc, блокирующий взаимодействие между PD-1 и B7-H1.

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.

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.

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 WO 2013/079174 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).

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 цепей 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).

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 WO 2007/005874, 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).

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 № 7943743 и патентной публикации США № 20120039906.

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 WO 2010/027827 и WO 2011/066342).

Ингибиторы LAG-3.

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, 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, WO 2010/019570 и WO 2014/008218. В некоторых вариантах осуществления антитело против LAG-3 представляет собой гуманизированное антитело против LAG-3, описанное в WO 2015/138920.

Ингибиторы ТІМ-3.

В одном варианте осуществления комбинация, описанная в настоящем документе, включает в себя ингибитор ТІМ-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 ТІМ-3 описаны в патенте США № 8552156, WO 2011/155607, EP 2581113 и патентной публикации США № 2014/044728. В некоторых вариантах осуществления антитело против ТІМ3 представляет собой гуманизированное mAb ABTIM3, описанное в WO 2015/117002.

Ингибиторы CTLA-4.

В одном варианте осуществления комбинация, описанная в настоящем документе, включает в себя ингибитор СТLА-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.

Иллюстративные антитела против CTLA4 включают в себя тремелимумаб (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 № 5811097.

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 со 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.

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.

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), нитрозомочевиной (например, кармустином, стрептозоцином), триазенами (например, декарбазином, темозололмидом) и координационными комплексами платины (например, цисплатином, карбоплатином, оксалиплатином).

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, фамицикловир, 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.

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, циноксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, спарфлоксацин, флероксацин, перлоксацин, левофлоксацин, гареноксацин и гемифлоксацин), метенамин, нитрофурантоин, пенициллины (например, пенициллин G, пенициллин V, метициллин, оксициллин, клоксициллин, диклоксициллин, нафцилин, ампициллин, амоксициллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин и пиперациллин), цефалоспорины (например, цефазолин, цефалексин, цефадроксил, цефокситин, цефаклор, цефпрозил, 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).

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие молекулы против GITR можно составлять совместно с противопаразитическим средством. Иллюстративные противопаразитические средства включают в себя, без ограничения, противомалярийные средства (например, хинолины, включая хлороквин, мефлоквин, хинин, квинидин и примаквин; диаминопиримидины, включая пириме-

тамин, 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.

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, бутоконазол, фентиконазол, изоконазол, оксиконазол, сертаконазол, сулконазол, тиоконазол), 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 галопрогин.

Наборы.

Композиции против GITR по настоящему изобретению можно предоставлять в наборе. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула против GITR, как правило, находятся 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, содержат 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 со вторым или третьим средством 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.

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 антигенымишени обсуждают в настоящем документе; другие, известные в данной области, также находят применение.

В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат цитотоксическое средство. Например, наборы могут содержать агонистические антитело или антигенсвязывающую молекулу, которые связываются с ${\rm CD4}^+$ ${\rm CD25}^+$ регуляторными Т-клетками (${\rm T}_{\rm per}$) и уменьшают их количество или истощают их. Иллюстративные истощающие ${\rm T}_{\rm per}$ 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.

В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат ингибитор коингибирующего сигнала. Иллюстративные ингибиторы включают в себя ингибиторы СТLА-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 СТLА-4. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат антитело, связывающее и ингибирующее LAG3. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат антитело, связывающее и ингибирующее ТІМ3. 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.

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.

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

Способы усиления ответов Т-клеток.

Состояния, подлежащие лечению или предотвращению.

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.

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.

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 (ТАА), 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 и: 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).

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.

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.

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.

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.

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 Мусоbacterium, 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.

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/к, 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 составлять 1-10 мг/кг. Дозирование может являться ежесуточным, 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.

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.

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 одну 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 времением.

ни 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 со вторым средством.

В некоторых вариантах осуществления антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающую молекулу против GITR вводят совместно со 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, подвергаемого 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.

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.

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 альфа-вирусы, 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 мартышковых (В-вируса) и поксвирусов.

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.

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.

В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие мо-

лекулы 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).

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 (T_{per}) и уменьшают их количество или истощают их. Иллюстративные истощающие T_{per} 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.

В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие молекулы против GITR вводят совместно с ингибитором коингибирующего сигнала. Иллюстративные ингибиторы включают в себя ингибиторы СТLА-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 СТLА-4. В некоторых вариантах осуществления антитела против GITR вводят совместно с антителом, связывающим и ингибирующим ТIM3. 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, Ехрегт Оріп 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.

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 со 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.

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

Фиг. 1A-1D иллюстрирует эпитопное картирование mAb против GITR по изобретению.

На фиг. 1А изображены результаты водородно/дейтериевого обмена в сочетании с анализами массспектрометрии (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 фиг. 1В изображены схемы конструкций с N-концевой делецией, полученных с использованием внеклеточного домена из GITR человека (hGITR ECD).

На фиг. 1С 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 фиг. 1D изображены результаты аланинового сканирующего мутагенеза. МАВ7 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: RPTGGPGCGPGRLLGTGTDARCCRV_HTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGD) в качестве области и потенциального эпитопа, вовлеченного в связывание MAB1 и MAB7 (исходного mAb).

На фиг. 2A-2E изображены результаты экспериментов связывания антитела MAB против GITR.

Фиг. 2A и 2B иллюстрируют, что MAB4 и MAB5 специфически связывают GITR человека и яванского макака (2A), но не грызунов (2B), как определено посредством анализов ELISA.

Фиг. 2C иллюстрирует, что MAB7 разделяет сходный профиль связывания GITR человека и яванского макака, но не GITR мыши, посредством анализа ELISA.

Фиг. 2D иллюстрирует, что MAB7 конкурирует со связыванием GITR-лиганд, как определено посредством конкурентных анализов FACS.

Фиг. 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 $^{\text{TM}}$ также подтвердил, что антитела не связываются с другими белками, не являющимися мишенями (не показано).

На фиг. 3A-3D показана внутриклеточная передача сигналов в клетках 293, сконструированных для экспрессии GITR.

Фиг. ЗА иллюстрирует, что рекомбинантный лиганд GITR человека (GITR-L) активирует внутриклеточную передачу сигналов в клетках 293, стабильно трансфицированных для сверхэкспрессии GITR человека.

Фиг. 3В 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 EC_{50} приблизительно 2,5 нМ для агонистических антител в присутствии перекрестно сшивающего средства).

Фиг. 3С иллюстрирует, что перекрестно сшитое антитело MAB активирует внутриклеточную передачу сигналов в клетках, поскольку MAB7 и MAB8 стимулируют также активацию NFкВ в клетках 293, стабильно трансфицированных GITR человека и репортерным геном NFкВ-люцифераза, сходным образом с перекрестно сшитым MAB4.

Фиг. 3D иллюстрирует, что перекрестно сшитые MAB4 и MAB5 стимулируют активацию NFкВ в клетках 293, стабильно трансфицированных GITR яванского макака и репортерным геном NFкВлюцифераза. Сходную активацию наблюдали для перекрестно сшитого MAB7 (данные не представлены).

На фиг. 4A-4C 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.

Фиг. 4A иллюстрирует, что MAB7 является коактиватором $CD4^+$ T-клеток и стимулирует пролиферацию T-клеток для $CD4^+$ T-клеток.

Фиг. 4В иллюстрирует, что МАВ7 является коактиватором CD8⁺ T-клеток и стимулирует пролиферацию Т-клеток для CD8⁺ T-клеток.

Фиг. 4С иллюстрирует, что продукция цитокинов, например, продукция IFN_γ, после привлечения TCR является увеличенной в сочетании с MAB7. Сходные результаты наблюдали для MAB4 и 5 (данные не представлены).

Фиг. 5A-5D иллюстрирует активность MAB7 в ADCC in vitro в клетках, экспрессирующих GITR на различных уровнях. На каждой из фиг. 5A-5D изображены результаты активности ADCC с использованием контрольного антитела или антитела MAB7 при различных уровнях экспрессии GITR. MAB7 является способным индуцировать передачу сигнала посредством FcgRIIIa с увеличенной активностью при

увеличенных уровнях передачи сигнала посредством GITR.

Фиг. 6A-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 ч, затем подвергали контрольному воздействию или воздействию MAB7 в различных концентрациях в течение 30 мин, затем фиксировали и окрашивали с использованием конъюгированных с флуорофором антител и анализировали посредством проточной цитометрии.

На фиг. 6A изображены результаты, показывающие повышающую регуляцию экспрессии hGITR на стимулированных $\mathrm{CD8}^+$ T-клетках.

На фиг. 6В изображены результаты связывания антитела против hGITR с T-клетками по окрашиванию hFc, показывающие, что MAB7 может связываться с hGITR, экспрессированным на мышиных CD8 $^+$ T-клетках.

На фиг. 6С и 6D показано, что связывание MAB7 со стимулированными $CD8^+$ Т-клетками коррелирует с увеличенной активацией Т-клеток, как показано по окрашиванию внутриклеточного pIKK (6C) и по активации Т-клеток (6D). *p<0,05, **p<0,005.

Фиг. 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 фиг. 7A 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 15 суток.

На фиг. 7В и 7С изображены результаты для цельной крови.

На фиг. 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<0.0005).

Фиг. 8А-8Е иллюстрирует, что МАВ7 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 фиг. 8А изображены результаты для регуляторных Т-клеток через 3 суток после дозирования.

На фиг. 8B-8C изображены результаты для уровней лимфоцитов (8B) и активированных CD8⁺ Т-клеток (8C), 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 MAB7.

На фиг. 8D показано соотношение $T_{3\varphi\varphi}/T_{per}$, полученное в результате у подвергнутых обработке животных, как определено по общему количеству внутриопухолевых активированных $CD8^+$ Т-клеток по сравнению с $CD4^+$ FOXP3+ T_{per} для получения соотношений $T_{3\varphi\varphi}/T_{per}$.

На фиг. 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).

Фиг. 9A-9C иллюстрирует, что экспрессия PD-1 подвергается повышающей регуляции на CD8⁺ Т-клетках в опухолях Colon26, так же как в селезенке, после обработки мышиным 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 фиг. 9A показаны результаты для положительных по PD-1 клеток, оцененные как процент от общего количества ${\rm CD19^{\circ}CD3^{+}CD8^{+}}$ T-клеток.

На фиг. 9В показаны результаты для положительных по PD-1 клеток, нормализованные по размеру опухолей, по абсолютному количеству PD-1⁺CD19⁻CD3⁺CD8⁺ T-клеток на 1 мм³ объема опухоли.

На фиг. 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).

Фиг. 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.

Фиг. 11 иллюстрирует экспрессию LAG3 (первый столбец), ТIM3 (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 контрольным для изотипа Ab. Изображены результаты в моделях Colon26 на мышах, обработанных антителом против GITR (IgG2a-DTA-l) 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 резуль-

таты для образцов селезенки. Экспрессия LAG3, TIM3 и PD1 подвергается повышающей регуляции в $CD8^+$ Т-клетках в опухолях Colon26 после обработки a-GITR и a-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. Человеческие антитела MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 и MAB8 получали посредством модификации мышиного 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 мышиного антитела, MAB1. MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 и MAB8 обладают намного более высокой гомологией с человеческой зародышевой последовательностью, чем исходное мышиное антитело, и таким образом, иммунная система человека должна быть более толерантной к ним.

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 вариабельных областях тяжелой и легкой цепей эталонного Fab (как правило, последовательности внутри CDR3 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи). Поскольку эти BSD тяжелой и легкой цепей сохраняются во всех библиотеках, сконструированных в ходе процесса, каждая библиотека является сфокусированной на эпитопе, и полученные антитела Humaneered® сохраняют эпитопную специфичность исходного мышиного антитела.

Затем получают библиотеки полноразмерных цепей (в которых полноразмерная вариабельная область легкой или тяжелой цепи заменена на библиотеку человеческих последовательностей) и/или кассетные библиотеки (в которых часть вариабельной области тяжелой или легкой цепи мышиного Fab заменена на библиотеку человеческих последовательностей). Бактериальную систему секреции 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 характеризации 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.

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 вариабельных 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.

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 NFкB для подтверждения связывания hGITR и агонистической активности.

Клонирование мышиных V-областей.

ДНК вариабельной области из мышиного моноклонального MAB1 амплифицировали посредством RT-ПЦР с PHK, полученной из линии клеток гибридомы, с использованием стандартных способов. Вариабельную 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)). Вариабельную 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 вариабельных областей тяжелой и легкой цепей вставляли в вектор pcDNA3.1 и последовательность подтверждали. Векторы для тяжелой и легкой цепей 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 AAGASHHHHHH (SEQ ID NO: 13) на C_H1) по NcoI (5') и NheI (3'); Vк в KB1296 по NcoI (5') и BsiWI (3'). Затем эти отдельные векторы для тяжелой и легкой цепей 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

Фрагменты Fab экспрессировали посредством секреции из E.coli с использованием экспрессирующих векторов KaloBios. Клетки выращивали в среде $2\times YT$ до $OD_{500} \sim 0,6$. Экспрессию индуцировали добавлением IPTG до 100 мкМ и встряхиванием в течение 4 ч 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.

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 МАВ1 является наиболее близкой к человеческой зародышевой VкIII, поэтому смесь двух библиотек KaloBios, содержащих зародышевые линии VкIII (КВ1423 и КВ1424), использовали для получения кассетных библиотек Vк. Библиотеки KaloBios, содержащие зародышевые линии V_н3 (КВ1413, КВ1414), использовали для конструирования кассетных библиотек Vh. Лва типа кассет конструировали посредством перекрывающейся ПЦР: предварительные кассеты (8C1VK3FE-01 и MAB1V_H3FE-01), содержащие человеческие последовательности в кассетах FR1, CDR1 и FR2, и кассеты FR3 (MAB1VK3FR3-01 и MAB1V $_{
m H}$ 3FR3-01)), 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 КрпІ (3'); каждую кассетную библиотеку Vк клонировали в вектор КВ1296-В (модифицированный вариант вектора KaloBios KB1296, обладающий молчащим участком HindIII, добавленным в FR4) по NcoI (5') и HindIII (3'). Полученные плазмидные библиотеки Vh или Vк затем комбинировали с комплементарной цепью из оптимизированного исходного Fab (MAB1opVK или MAB1 opV_H (например, предварительную библиотеку Vh комбинировали с оптимизированным эталонным вектором Vк) посредством расщепления посредством BssHII и ClaI и последующего лигирования для получения библиотек бицистронных векторов, экспрессирующих полноразмерные Fab.

Ни один из предварительных клонов $V_{\rm H}3$ не связывал GITR человека с высокой аффинностью, таким образом, конструировали вторую предварительную библиотеку VH3 (MAB1VH3FE-02). Эта библиотека содержит человеческие последовательности в FR1, FR2 и набор CDR2, кодирующих либо исходный мышиный остаток, либо выбранный человеческий зародышевый остаток во всех положениях. Последовательности области FR3 в этой библиотеке происходили из шести клонов, выбранных из библиотеки VH3FR3 (MAB1VH3FR3-01).

Конечную библиотеку полноразмерных цепей Vк (MAB1VK3FCL-01) конструировали посредством комбинации клонов из предварительной библиотеки VK и кассетной библиотеки VKFR3 с мутантными CDR2 VK, кодирующими либо исходный мышиный, либо выбранный человеческий зародышевый остаток во всех положениях. Полученную библиотеку полноразмерных цепей Vk клонировали в KB1296b по участкам Ncol и HindIII. Эту библиотеку полноразмерных цепей VK подвергали спариванию с рядом избранных клонов из библиотеки VH3FR3 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 (MAB1VH3FL-01) получали с использованием клонов, избранных из второй предварительной библиотеки VH3 (MAB1VH3FE-02), с набором последовательностей CDR2, содержащих либо исходный мышиный, либо человеческий остаток в каждом положении. Эту библиотеку полноразмерных цепей $V_{\rm H}$ клонировали в KB1292-his по участкам Ncol и KpnI. Для получения конечной библиотеки, экспрессирующей полноразмерные цепи человеческого Fab, избранные клоны полноразмерных цепей VK комбинировали с библиотекой полноразмерных цепей $V_{\rm H}$ по участкам BssHII и ClaI.

Общий способ ELISA.

Слитый белок из рекомбинантного человеческого GITR и человеческого Fc (hGITR-hFc) использо-

вали 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 1 ч 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 1 ч 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.

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).

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 МАВ4.

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 р50Н в качестве матрицы ДНК. Обратный праймер (TCTGGCGCAGTAATACACGGCC, SEQ ID NO: 110) включал аргинин вместо лизина; прямой праймер (NNKGCCTATGGCCATGATGGCG, 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 pfuUltrall (Strategene) в объеме реакционной смеси 50 мкл. Условия ПЦР представляли собой 94°С в течение 3 мин в течение 1 цикла; 94°С в течение 15 с, 52°С в течение 20 с и 65°С в течение 5 мин в течение 30 циклов и, наконец, 1 цикл при 72°С в течение 5 мин. DpпI (2 ед.) добавляли в реакционную смесь для ПЦР и инкубировали при 37°С в течение 30 мин для удаления матрицы р50Н. Амплифицированные варианты тяжелой цепи МАВ4 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 DH5α (Invitrogen) с отбором в присутствии ампициллина.

Клоны, несущие тяжелую цепь МАВ7 и МАВ8, отбирали посредством ПЦР колоний с использованием прямого (GCCTTTCTCTCCACAGG, SEQ ID NO: 112) и обратного (GGCAAACAACA-GATGGCTGG, SEQ ID NO: 113) праймеров, следуя протоколу GoTaqClear (Promega). Условия ПЦР представляли собой 94°С в течение 3 мин в течение 1 цикла; 94°С в течение 10 с, 55°С в течение 30 с, 72°С в течение 45 с 25 раз и, наконец, один цикл при 72°С в течение 5 мин. Реакционные смеси после ПЦР очищали для секвенирования посредством инкубации образцов при 37°С в течение 30 мин и 80°С в течение 15 мин с экзонуклеазой I и щелочной фосфатазой креветки. Образцы после ПЦР секвенировали, и результаты анализировали с использованием программного обеспечения Clone Manager.

Продукция и очистка антител.

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.

036467

MAB2 - p35H+p35kappa MAB3 - p38H+p38kappa MAB4 - p50H+p35kappa MAB5 - p51H+p35kappa MAB6 - p56H+p35kappa MAB7 - pMAB7H+p35kappa MAB8 - pMAB8H+p35kappa

Антитело очищали из супернатантов клеток 293 Freestyle с использованием 5-мл колонки HiTrap HP с белком A (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.

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 1 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 ч 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 ч при комнатной температуре и затем промывали три раза с использованием PBST. Антитело против человеческой каппа (Sigma #A7164), коньюгированное 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 ч 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 2н. H₂SO₄. Планшет считывали при 450 нм в спектрофотометре.

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

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°С. Планшет блокировали с использованием раствора 1% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре и затем промывали три раза с использованием PBST. Затем MAB разводили до 0,5 или 1 мкг/мл в PBS и 20 мкл добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 1 ч 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 ч 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.

Для получения линии клеток 293-hGITR-NFкВ с репортерным геном клетки 293 стабильно трансфицировали репортерным геном NFкВ-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-часовой 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 Fcγ или белка A перед использованием в анализе репортерного гена.

Получали клональные линии клеток Daudi, экспрессирующие уровни GITR, наблюдаемые в иммунопитах человека.

Получали PBMC яванского макака и связывание GITR определяли с использованием MAB. 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% фиколла Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare #17-1440-03, разведенного в PBS) и пробирки центрифугировали при 2000×g в настольной центрифуге в течение 30 мин при комнатной температуре, без торможения. Слой плазмы осторожно удаляли без нарушения диффузного слоя PBMC поверх фиколла. 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×g в настольной центрифуге в те-

чение 15 мин при комнатной температуре. Супернатант осторожно отбирали и добавляли 4 мл $1 \times$ лизирующего раствора BD (BD #555899) и образцы осторожно перемешивали на встряхивателе.

После инкубации при комнатной температуре в темноте в течение 3 мин 40 мл PBS добавляли к каждому образцу и их центрифугировали при 200×g в настольной центрифуге в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант осторожно отбирали, и осадок промывали два раза в 45 мл PBS перед центрифугированием при 200×g в настольной центрифуге в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученный осадок фильтровали и ресуспендировали при 1×10⁶ клеток/мл в среде для тестирования СТL (СТLТ-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 тозилом 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 ч. Для окрашивания на сутки 0, 200 мкл PBMC помещали в 96-луночный круглодонный планшет (Corning, #3799). Для образцов, стимулированных в течение 48 ч, 100 мкл супернатанта осторожно удаляли, оставшееся содержимое лунки осторожно ресуспендировали и 200 мкл переносили в планшет для окрашивания FACS.

FACS

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 мин на льду, с защитой от света, затем промывали и ресуспендировали в 100 мкл холодного буфера для FACS, содержащего 2 мкг/мл МАВ7 или контрольного антитела для изотипа IgG1 человека, и планшеты инкубировали в течение 30 мин 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)), затем планшеты инкубировали в течение 30 мин на льду с защитой от света и затем центрифугировали в настольной центрифуге при 3200 об/мин в течение 1 мин при 4°C. Клетки промывали в буфере для FACS, затем ресуспендировали в 100 мкл BD CytoFix (BD #554655), и планшеты инкубировали в течение 15 мин 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°С до готовности для считывания. На сутки считывания FACS планшет центрифугировали в настольной центрифуге при 3200 об/мин в течение 1 мины 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.

Мышей с нокином hGITR получали посредством замены полной кодирующей последовательности (экзонов и интронов) GITR мыши на последовательность кДНК GITR человека. Нетранслируемые последовательности выше инициирующего кодона и ниже стоп-кодона происходят из генома мыши. Нацеливание генов выполняли стандартными способами в клетках ES BALB/с с использованием нацеливающих векторов, несущих гомологичные плечи, происходящие из BALB/с. 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/с, 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/с дикого типа удаляли рекомбиназу Cre.

Мышей с нокином hGITRL получали посредством замены мышиной 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 двух поколений для получения гомозиготных мышей с двойным нокином.

Функциональные анализы.

Функциональную активность MAB тестировали в анализе репортерных генов с NFкВ по агонистической активности. MAB разводили до 6 мкг/мл в PBS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в присутствии/в отсутствие 3-кратного избытка перекрестно сшивающего средства фраг-

мента $F(ab')_2$ козы против антитела человека, специфического для Fс γ . Альтернативно, MAB разводили до 6 мкг/мл в PBS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в присутствии/в отсутствие 2-кратного избытка белка A. Затем 10 мкл инкубированного MAB добавляли в 384-луночный белый планшет для анализа с прозрачным дном. Линию клеток HEK-293, стабильно трансфицированных hGITR и репортерным геном с NFкB, разводили до 5×10^5 клеток/мл и 20 мкл суспензии клеток добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 24 ч при 37°C в инкубаторе для культивирования клеток. 30 мкл Cell Bright Glo добавляли в каждую лунку и планшет считывали по люминесценции в Acquest.

Способность МАВ блокировать связывание лиганда оценивали с использованием исходных клеток НЕК293 с репортером NFкB и стабильные клетки с hGITR использовали в конкурентных анализах связывания и в анализе FACS. Кратко, собранные клетки рассевали при 1×10^6 клеток на 1 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/лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч 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/лунку и планшеты инкубировали в течение 1 ч 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/лунку и планшеты инкубировали в течение 30 мин на льду с защитой от света. Клетки промывали в буфере для FACS, затем клетки фиксировали с использованием 100 мкл/лунку BD CytoFix (BD Biosciences) и инкубировали в течение следующих 15 мин на льду с защитой от света. Фиксированные клетки промывали дважды, ресуспендировали в конечном объеме 150 мкл/лунку буфера для FACS и образцы анализировали в течение 1 недели в проточном цитометре BD Fortessa (BD Bioscience).

Агонистическую активность МАВ можно также наблюдать для первичных Т-клеток, экспрессирующих эндогенные уровни GITR, посредством пролиферации и секреции цитокинов из первичных Т-клеток. МАВ конъюгировали с активированными тозилом бусинами М-280 (Invitrogen #142.04) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых экспериментах антитела-агонисты CD3 (ОКТ3) и CD28 (CD28.2) также конъюгировали с бусинами. 1×10⁵ свежеочищенных меченных CFSE PBMC человека рассевали в 10 мкл среды для тестирования CTL (CTL #CTLW-010) в 96-луночный круглодонный планшет для культивирования клеток. 100 мкл конъюгированных с МАВ 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 клеток 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.

Костимулирующую активность МАВ для Т-клеток также измеряли с использованием способа ELISpot для детекции IFNg. Кратко, планшеты для ELISPOT (Millipore MSIPS4510) получали посредством покрытия с использованием 70% этанола в течение 2 мин с последующей промывкой PBS и инкубацией в течение ночи с 50 мкг моноклонального антитела против IFNу в PBS (Mabtech 3321-3). Очищенные CD8⁺ Т-клетки выделяли из селезенок мышей, обработанных носителем или MAB7 через 15 суток после дозирования. Т-клетки рассевали в покрытые планшеты для ELISPOT при 0,25×10⁶ клеток на лунку в среде для CTL (CTL Test-medium (CTL CTLT-005), 1 мМ Hepes (Mediatech MT25-060-Cl), 2 мМ Lглутамин (Mediatech MT25-005-Cl), 1 мм пируват натрия (Mediatech MT25-000-Cl), 100 мкМ МЕМ заменимые аминокислоты (Mediatech MT25-025-Cl), 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 ч для повышающей регуляции экспрессии МНС класса II и промывали средой для СТL перед добавлением Т-клеток. Клетки опухолей Colon26 (20000/лунку) добавляли к СТL и инкубировали при 37°C в течение 24-48 ч. Затем планшеты промывали с использованием 0,05% Tween-20/PBS и 10 мкг биотинилированного Mab против IFNg (Mabtech R4-6A2-биотин) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 ч 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 ч при комнатной температуре. Затем клетки промывали с использованием 0,05% Тween-20/PBS и субстрат АЕС, полученный в соответствии с протоколом производителя (Sigma A6926), добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 4 мин при комнатной температуре. Затем планшеты промывали водопроводной водой, высушивали и сохраняли в темноте в течение 24 ч перед считыванием.

Способность МАВ индуцировать ADCC измеряли с использованием анализа репортера. В 96-луночном белом планшете (Perkin Elmer F6178) 2×10^3 клеток hGITR-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 MAB добавляли в лунки и планшеты инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе для культивирования клеток. После инкубации 60 мкл Bright-Glo добавляли в каждую лунку и планшет считывали в люминометре.

Анализы спленоцитов in vitro проводили с использованием селезенок, 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 рассевали при 100000 клеток/лунку в RPMI (HyClone SH30027,02)+10% человеческой сыворотки (Cellgro 35-060.C1)+1× пен./стрепт./L-глют. (Gibco 15 140-112) в 96-луночном планшете для культивирования тканей (Costar 3799). Для стимуляции Т-клеток 0,4 мкг/мл антитела против CD3 мыши (еВіоsсіенсе 16-0031-86) и 0,8 мкг/мл антитела против CD28 мыши (еВіоsсіенсе 13-0281-86) добавляли в соответствующие лунки. Через 48 ч клетки либо анализировали немедленно, либо стимулировали с использованием контрольного или терапевтического антитела в течение от 30 мин до 96 ч, окрашивали с использованием контрольного или терапевтического антитела в течение от 30 мин до 96 ч, окрашивали с использованием контрольного или терапевтического антитела в течение от 30 мин до 96 ч, окрашивали с использованием контрольного или терапевтического антитела в течение от 30 мин до 96 ч, окрашивали с использованием контрольного или терапевтического антитела в течение от 30 мин до 96 ч, окрашивали с использованием контрольного или терапевтического антитела в течение от 30 мин до 96 ч, окрашивали с использованием контрольного или терапевтического антитела и анализировали посредством проточной цитометрии.

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 мин при 4°C. Для внутриклеточного окрашивания после инкубации с антителами против поверхности клеток клетки промывали, фиксировали и пермеабилизовывали с использованием буфера FOXP3 Fix/Perm (Biolegend 421403) в соответствии с протоколом производителя и инкубировали с антителом против фосфо-IKKa/b (Cell Signaling 2697) или антителом против FOXP3 (еВioscience 50-4774-42) в течение 30 мин при 4°C. 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.).

Суспензии отдельных клеток получали из опухолей и селезенок и окрашивали для анализа посредством проточной цитометрии. Например, клеточные маркеры оценивали с использованием следующих антител: a-CD8-BUV395 (клон 53-6.7, BD Biosciences 563786), a-CD19-APC-Cy7 (клон 6D5, BioLegend 115530), a-CD3-PerCp (клон 145-2C11, BD Bioscience 553067), a-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±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.

Модели опухолей in vivo.

Линию клеток мышиной карциномы ободочной кишки Colon26 получали из Отдела лечения и диагностики злокачественных опухолей в Национальном институте онкологии США (ампула: 0507238). Клетки мышиной карциномы Colon26 культивировали в среде RPMI 1640 (HyClone SH30027.02), дополненной 10% FBS (Gibco 10099-141), 10 мМ HEPES (Gibco 15630-080) и 1 мМ пируватом натрия (Gibco 11360-070). Самкам мышей с нокином hGITR-hGITRL в возрасте 8-10 недель инъецировали подкожно в бок 0,5×106 клеток Colon26 в 100 мкл RPMI. Опухоли измеряли с использованием цифрового штангенциркуля, и объем опухоли рассчитывали с использованием уравнения (L×W²)/2. Когда опухоли достигали среднего размера 180 мм³, 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.

Тестирование суррогатной модели GITR и Colon26 на мышах.

Самок мышей BALB/с в возрасте 6-8 недель из Charles River Labs использовали в качестве экспериментальных животных. Для имплантации клетки ресуспендировали в $1 \times$ сбалансированном солевом растворе Хенкса (Hyclone Cat# SH30030.02) и имплантировали с помощью подкожной инъекции в нижнюю часть правого бока с использованием иглы $28 \times g$ (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 мышиного химерного IgG2a посредством слияния последовательностей вариабельной области DTA-1 с мышиными областями Fc IgG2a для получения IgG2a-DTA-1.

Комбинированная терапия.

Для оценки активности in vivo суррогатного антитела против GITR (мышиного 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 ± SEM объеме опухоли 115±7 мм³. 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 и 5 мг/кг соответственно, группа 4), как описано в табл. 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 внутрибрющинной 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 (ТТЕ), оцененных посредством анализа выживаемости Каплана-Мейера.

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 $^+$ T-клеток в опухолях и селезенках. Значения р рассчитывали с использованием t-критерия, *p<0,05 и **p<0,005.

Результаты.

Аминокислотные последовательности мышиной и эталонной V-области

Продукты RT-ПЦР из клеток гибридомы, экспрессирующих MAB1, секвенировали и эти последовательности в большой степени (95% или выше) подтверждали на уровне белка с использованием массспектрометра ThermoElectron LTQ-Orbitrap. Затем вариабельные области тяжелой и легкой цепей MAB1 клонировали в векторы KaloBios для получения эталонного Fab MAB1гFab. 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, MAB1гFab обладает глутаминовой кислотой в первом положении VK. Fab MAB1гFab обладает интактными мышиными V-областями из MAB1, слитыми с человеческими константными областями. В дополнение к MAB1гFab, конструировали оптимизированный Fab, MAB1орFab. Несколько аминокислотных остатков каркасной области в MAB1гFab заменены на человеческие зародышевые остатки в MAB1орFab.

Анализ аффинности эталонного и оптимизированного эталонного Fab.

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 (Ka (1/M c), Kd (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 MABlopFab обладал очень сходной Kd, но пятикратным улучшением Ka, указывающим на то, что замены аминокислот в MAB1rFab являются допустимыми.

Конструирование библиотеки и отбор Fab антитела Humaneered®.

Предварительную библиотеку тяжелой и легкой цепей и кассетную библиотеку FR3 семейства зародышевых последовательностей, ограниченных $V_{\rm H}3$ и VKIII, получали и подвергали скринингу посредством CLBA. 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 $V_{\rm H}$, клоны, поддерживающие связывание с GITR человека, идентифицированы

из кассетной библиотеки FR3 (MAB1VH3FR3-01), но не из предварительной библиотеки VH3 (MAB1V $_{H3}$ FE-01). Поскольку большинство членов предварительной библиотеки V $_{K}$ и кассетной библиотеки FR3 являлись положительными в CLBA, полный репертуар из этих двух библиотек использовали для конструирования библиотеки полноразмерных цепей V $_{K}$ (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 $_{K}$ hGITR клонов идентифицировали из библиотеки $_{K}$ (MAB1VH3FR3-01) посредством CLBA и подтвердили посредством специфической для GITR человека ELISA. Шесть из них использовали для спаривания с библиотекой полноразмерных цепей VK (MAB1V $_{K}$ 3FcL-01), для обеспечения экспрессии функционального Fab и скрининга этой библиотеки.

Поскольку клонов, связывающих hGITR с высокой аффинностью, не идентифицировали из предварительной библиотеки V_H (MAB1VH3FE-01), затем конструировали вторую предварительную библиотеку VH3 (MAB1VH3FE-02). Эта библиотека содержит либо исходный мышиный остаток, либо человеческий зародышевый (VH3 3-30) остаток в каждом положении последовательностей CDR1 и FR3 из шести выбранных клонов VHFR3. Множество связывающих hGITR членов идентифицировали как из библиотеки полноразмерных цепей VK (MAB1V κ 3FcL-01), так и из второй предварительной библиотеки V_H (MAB1VH3FE-02). Эти клоны подтверждали посредством специфического для GITR человека анализа ELISA содержащих Fab супернатантов клеток и ранжировали по ELISA hGITR для титрования аффинности.

На основании ELISA hGITR для титрования аффинности четыре клона полноразмерных цепей VK выбраны из библиотеки полноразмерных цепей VK (MAB1VK3FcL01) и шесть клонов выбраны из библиотеки MAB1V $_{\rm H}$ 3FE-02. Эти шесть клонов V $_{\rm H}$ использовали в качестве остова для конструирования библиотеки полноразмерных цепей V $_{\rm H}$ либо с остатком мышиного MAB1, либо с наиболее близким человеческим зародышевым (VH3 3-30) остатком в каждом положении в CDR2. Этот репертуар полноразмерных цепей V $_{\rm H}$ спаривали с четырьмя клонами полноразмерных цепей VK для получения конечной библиотеки полноразмерных цепей человеческого Fab. В CLBA идентифицировали множество связывающих hGITR клонов, подтвержденных посредством ELISA с использованием соответствующего культурального супернатанта в качестве источника Fab. Пять клонов полноразмерных цепей человеческого Fab (MAB2, MAB3, MAB4, MAB5 и MAB6) выбраны на основании анализа последовательности ДНК и результатов ELISA hGITR для титрования аффинности.

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

Пять полноразмерных цепей человеческих Fab (MAB2, MAB3, MAB4, MAB5 и MAB6) экспрессировали и очищали. Затем кинетику связывания этих человеческих Fab сравнивали с кинетикой оптимизированного эталонного Fab (MAB1opFab) с использованием системы ForteBio Octet (цифровые данные обобщены в табл. 3).

Таблица 3 Аффинность Fab для GITR человека

Аффинность гао для Отт к человека	
Fab	KD [M]
MAB1opFab	1,25E-8
(a)*	1,202 0
MAB2 (a)	6,84E-9
MAB3 (a)	2,98E-9
MAB1opFab	6,59E-9
(b) *	0,002
MAB4 (b)	2,43E-9
MAB5 (b)	3,74E-9
MAB1opFab	1,47E-8
(c)*	
MAB6 (c)	5,94E-9

^{* (}a), (b), (c) обозначают три отдельных эксперимента Forte. Результаты представляют собой глобальное соответствие двух повторов образца.

Аминокислотная последовательность антител MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6 и процент идентичности с человеческой зародышевой последовательностью.

Аминокислотные последовательности вариабельной области пяти Fab (MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6) показаны в табл. 1. Процент идентичности с человеческими зародышевыми последовательностями пяти Fab определяли посредством выравнивания аминокислотных последовательностей Vh

и Vк против одной зародышевой последовательности (VKIII L16/A27 и VH3 3-30 соответственно; табл. 4). Остатки в CDRH3 и CDRL3 исключали из расчета для каждой цепи.

Таблиц

Процент идентичности пяти Fab с человеческими зародышевыми последовательностями

Fab	VKIII L15/A27	VH3 3-30	Fv		
MAB2	95%	86%	90%		
MAB3	98%	85%	91%		
MAB4	95%	85%	89%		
MAB5	95%	83%	89%		
MAB6	95%	82%	88%		
MAB7	95%	85%	89%		
MAB8	95%	85%	89%		

Консервативность антигенного эпитопа GITR человека.

Консервативность антигенного эпитопа оценивали посредством непрямого конкурентного ELISA. Все пять Fab блокировали связывание исходного мышиного антитела MAB1 с GITR человека, что указывает на то, что эти человеческие Fab сохраняют эпитопную специфичность исходного мышиного антитела

Анализ антигенной специфичности MAB4 и MAB5 посредством ELISA.

Для тестирования того, сохраняется ли антигенная специфичность исходного мышиного антитела MAB1 в IgG, MAB2, MAB3, MAB4 и MAB5, связывание антител с панелью человеческих TNFR тестировали в анализе ELISA. Результаты одного из таких анализов с MAB4 и MAB5 (фиг. 2C) показывают, что MAB4 и MAB5 сохраняют высокую специфичность для GITR, сходную с мышиным антителом MAB1. Сходные результаты получены с MAB2, MAB3 и MAB6.

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

Исходное мышиное антитело MAB1 связывается с белком GITR человека и яванского макака, но не грызунов. На фиг. 2A, 2B 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.

Аффинность связывания антител-агонистов GITR MAB4 и MAB5 для GITR человека (hGITR) и яванского макака (cGITR), определяли посредством анализа Biacore, см. табл. 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 ProtagenTM.

Таблица 5 Аффинность связывания MAb с GITR человека и яванского макака

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

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.

Антитела анализировали в анализах репортерных генов по функциональной активности (фиг. 3). Каждое из IgG MAB4, MAB5, MAB7 и MAB8 индуцирует активность NFкB при перекрестном сшивании

на уровнях, сходных с лигандом GITR (GITR-L), см. фиг. 3A-3D. Сходные результаты получены с MAB2, MAB3 и MAB6 (данные не представлены).

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. фиг. 2D.

Для подтверждения функциональной активности по отношению к эндогенному GITR антитела конъюгировали с бусинами и инкубировали с очищенными меченными CFSE PBMC человека. МАВ7 индуцирует усиление пролиферации как CD4⁺ Т-клеток (фиг. 4A), так и CD8⁺ Т-клеток (фиг. 4B) по сравнению с антителом для контроля изотипа. Это усиление пролиферации сопровождалось также увеличением секреции нескольких цитокинов, включая IFNγ (фиг. 4C), TNFα, 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 IFNγ 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.

Обнаружено также, что MAB7 обладает способностью индуцировать передачу сигнала FcgRIIIa (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 FcgRIIIa в анализе in vitro и что способность MAB7 индуцировать передачу сигнала FcgRIIIa коррелирует с уровнем рецептора, экспрессированным на поверхности клеток Daudi (т.е. более высокие уровни рецептора эквивалентны более сильной индукции передачи сигнала FcgRIIIa), см. фиг. 5.

hGITR экспрессируется на Т-клетках и является функциональным у мышей с нокином hGITR-hGITRL и культивировали либо без стимуляции, либо со стимуляцией с использованием антител а-CD3 и а-CD28 в течение 24, 48, 72 или 96 ч. 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 (фиг. 6A). МАВ7 эффективно связывается с hGITR, экспрессированным на CD8⁺ клетках (фиг. 6B); и связывание MAB7 со стимулированными Т-клетками коррелирует с увеличенной активацией Т-клеток, как измерено по окрашиванию pIKK (фиг. 6C) и маркеру активации Т-клеток CD25⁺ (фиг. 6D).

МАВ7 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 МАВ7 (n=10/временную точку), как описано выше. Опухоли измеряли дважды в неделю и объем опухоли рассчитывали с использованием уравнения (L×W²)/2. Для обработанных МАВ животных показана задержка роста опухолей Colon26. Через трое суток после обработки цельную кровь (фиг. 7В, 7С) и опухоли (фиг. 7D, 7Е) 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).

МАВ7 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 фиг. 8А изображены результаты для 3 суток после дозирования, показывающие, что количество T_{per} уменьшено у животных после обработки. На фиг. 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 $T_{эф}/T_{per}$ у подвергнутых обработке животных, как определено по общему количеству внутриопухолевых активированных CD8⁺ Т-клеток по сравнению с CD4⁺ FOXP3+ T_{per} , см. фиг. 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 IFNg позволяют предполагать увеличенный опухолеспецифический ответ IFNg в CD8⁺ Т-клетках у животных после обработки MAB7. (*p<0,05, ***p<0,005), см. фиг. 8E.

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 мышиного антитела против mGITR. На фиг. 9А-9С 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.

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. фиг. 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 mGITR (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 ТТЕ более 42 суток (медианное ТТЕ 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 Graph-Pad). Сравнения групп осуществляли посредством попарного сравнения с использованием критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона. Для всех статистических оценок уровень значимости устанавливали на р<0,05. Указана значимость по сравнению с контрольной группой носителя. Стабильное заболевание определяли как три последовательных измерения объема опухолей с изменением объема опухолей на 10% или менее.

Комбинированная терапия

Таблица 6

Комоннированная терапия					
Групп	Ab1 (5 Mr/kr, SC)	Ab2	п/группу		
a					
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 Mr/kr, IP)	n=10		

IP = внутрибрюшинно; SC = подкожно.

Экспрессию костимулирующих молекул оценивали в опухолях после введения антитела против GITR или антитела против GITR в комбинации с антителом против PD-1, см. фиг. 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⁺ Т-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.

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.

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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Антитело или его фрагмент, которые связывают член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей, индуцируемый глюкокортикоидами родственный TNFR белок (GITR), содержащие CDR вариабельной области тяжелой цепи и CDR вариабельной области легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из:
- (а) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 23 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29; и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (b) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 84; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 80; аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 85; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 82 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 83;
- (c) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 24 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 31; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (d) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 84; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 80; аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 86; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 82 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 83;
- (e) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22, аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 25 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34.
- (f) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 26 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (g) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 27; аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 29 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34;
- (h) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 22; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 25 и аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 109 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 33 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 34; и
- (i) аминокислотной последовательности V_HCDR1 SEQ ID NO: 84; аминокислотной последовательности V_HCDR2 SEQ ID NO: 80; аминокислотной последовательности V_HCDR3 SEQ ID NO: 109 и аминокислотной последовательности V_LCDR1 SEQ ID NO: 85, аминокислотной последовательности V_LCDR2 SEQ ID NO: 82 и аминокислотной последовательности V_LCDR3 SEQ ID NO: 83.
- 2. Антитело или его фрагмент по п.1, содержащие CDR вариабельной области тяжелой цепи и CDR вариабельной области легкой цепи:

аминокислотную последовательность $V_HCDR1\ SEQ\ ID\ NO:\ 22;$ аминокислотную последовательность $V_HCDR2\ SEQ\ ID\ NO:\ 25$ и аминокислотную последовательность $V_HCDR3\ SEQ\ ID\ NO:\ 29$ и

аминокислотную последовательность V_LCDR1 SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность V_LCDR2 SEQ ID NO: 33;и аминокислотную последовательность V_LCDR3 SEQ ID NO: 34.

- 3. Антитело или его фрагмент по п.1 или .2, где антитело или фрагмент антитела являются гуманизированными.
 - 4. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-3, содержащие область Fc антитела изотипа IgG.
- 5. Антитело или его фрагмент по пп.1-4, где вариабельная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16 и где вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17.
- 6. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или фрагмент антитела содержат тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17.
- 7. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-6, которые содержат вариабельный 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 вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.
 - 8. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-7, содержащие

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и $V_{\rm L}$, содержащую SEQ ID NO: 7;

 V_H , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

 V_H , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

 V_{H} , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и V_{L} , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и $V_{\rm L}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и $V_{\rm L}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; или

 $V_{\rm H}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, и $V_{\rm L}$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

- 9. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-8, которые содержат V_H , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.
- 10. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-9, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 106; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 70.
 - 11. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-10, содержащие

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

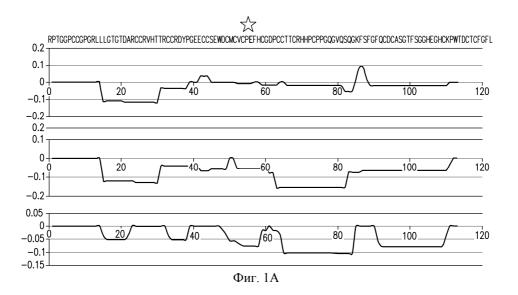
тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

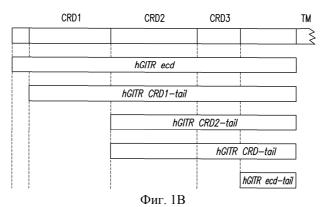
тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или

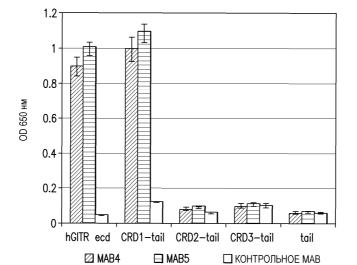
тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

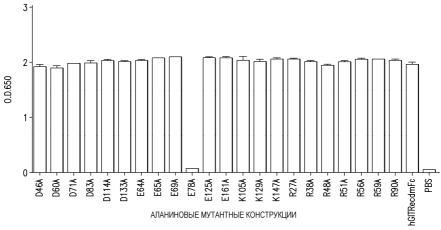
- 12. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-11, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.
- 13. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-12, перекрестно сшитые со вторым антителом или фрагментом антитела против GITR.
 - 14. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-13, где антитело является глигозилированным.
- 15. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-14 для усиления ответа Т-клеток и фармацевтически приемлемый носитель.
 - 16. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по любому из пп.1-14.
- 17. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по любому из пп.1-14, которые содержат V_H , кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 101, и V_L , кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 102.
 - 18. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.16 или 17.
- 19. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.16 или 17 или экспрессирующий вектор по п.18.
 - 20. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-14 для усиления ответа Т-клеток.
- 21. Применение по п.20, где ответ Т-клеток представляет собой ответ Т-клеток CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) или ответ CD4⁺ Т-клеток-помощников (Th).
- 22. Способ усиления ответа Т-клеток, включающий введение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-14 совместно с химиотерапевтическим средством или цитотоксином.
- 23. Способ по п.22, где ответ Т-клеток представляет собой ответ Т-клеток $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) или ответ $CD4^+$ Т-клеток-помощников (Th).
- 24. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-14 для лечения карцином у индивидуума, нуждающегося в этом.
 - 25. Применение по п.24, где индивидуум имеет колоректальный рак.



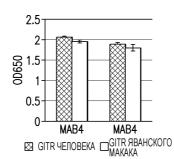




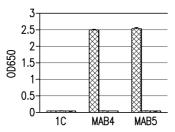
Фиг. 1С



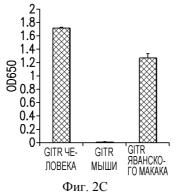
Фиг. 1D

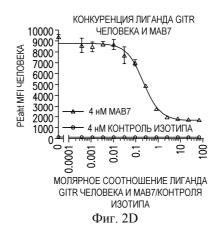


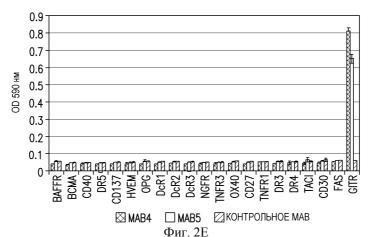
Фиг. 2А

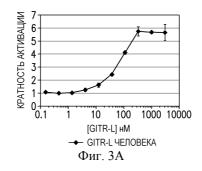


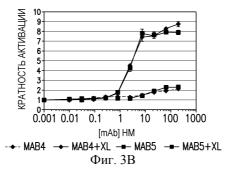
oxtimes GITR ЧЕЛОВЕКА oxtimes GITR МЫШИ oxtimes GITR КРЫСЫ Фиг. 2В

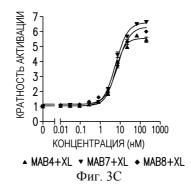


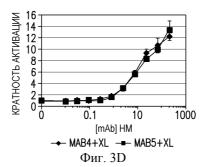


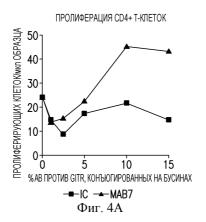


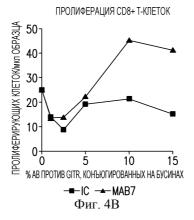


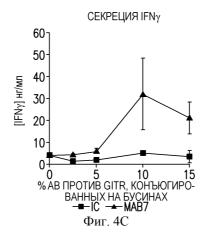


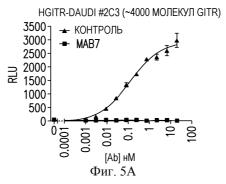


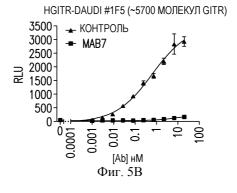


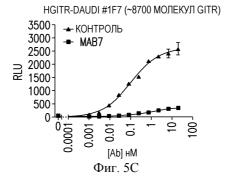


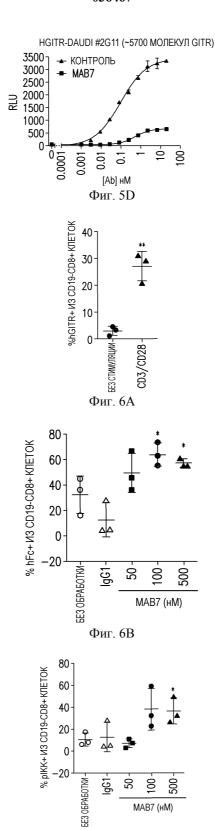






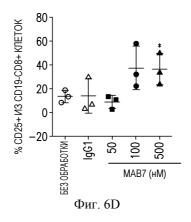


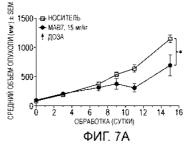


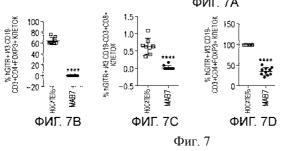


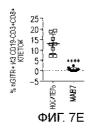
Фиг. 6С

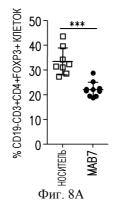
МАВ7 (нМ)

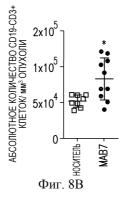


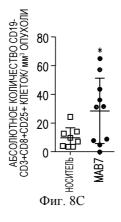


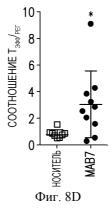


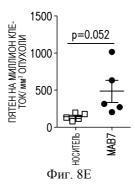


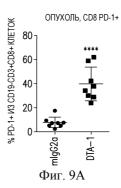


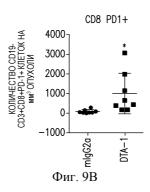


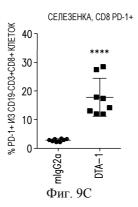


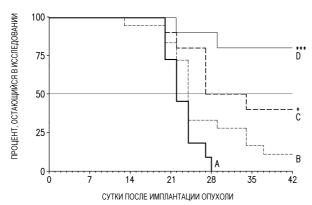












A — КОНТРОЛЬ ИЗОТИПА В ---- АНТИТЕЛО ПРОТИВ RMP1-14+АНТИТЕЛО ПРОТИВ migG2a C —— АНТИТЕЛО ПРОТИВ DTA-1+АНТИТЕЛО ПРОТИВ RMP1-14 $\Phi_{\text{ИГ}}.~10$

