

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037006**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.01.26**

(21) Номер заявки  
**201692459**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.06.03**

(51) Int. Cl. **A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА К ИНДУЦИРУЕМОМУ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ РЕЦЕПТОРУ  
ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ (GITR) И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **62/008,945; 62/082,980**

(32) **2014.06.06; 2014.11.21**

(33) **US**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/US2015/033991**

(87) **WO 2015/187835 2015.12.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ванг Чангиу, Лонберг Нилс,  
Корман Алан Дж., Селби Марк Дж.,  
Сринивасан Мохан, Хеннинг Карла,  
Хан Мишель Миньхуа, Чен Гуодонг,  
Хуанг Ричард, Чакраборти Индрани,  
Хуанг Хайчан, Вонг Сьюзан, Ли  
Хуимин (US)**

(74) Представитель:  
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина  
Е.М., Карпенко О.Ю., Строкова О.В.,  
Глухарёва А.О., Дементьев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2011028683**

**US-A1-2014065152**

**WO-A1-2005007190**

**WO-A1-2013039954**

**BULLIARD YANNICK ET AL.: "Activating  
Fc gamma receptors contribute to the  
antitumor activities of immunoregulatory receptor-  
targeting antibodies", THE JOURNAL OF  
EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER  
UNIVERSITY PRESS, US, vol. 210, no. 9, 26 August  
2013 (2013-08-26), pages 1685-1693, XP009176020,  
ISSN: 0022-1007, figures 1, 2**

**EP-A1-2481752**

**ANN L. WHITE ET AL.: "Conformation  
of the Human Immunoglobulin G2 Hinge Imparts  
Superagonistic Properties to Immunostimulatory  
Anticancer Antibodies", CANCER CELL, vol. 27,  
no. 1, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 138-148,  
XP055193819, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/  
j.ccell.2014.11.001, the whole document**

(57) Изобретение относится к антителам, связывающимся с человеческим индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR). Антитела или композиции, их содержащие, могут быть использованы для стимуляции антигенспецифичной Т-клеточной реакции, активации или костимуляции эффекторной Т-клетки, повышения продукции IL-2 и/или IFN-γ в Т-клетке, а также для стимуляции иммунной реакции и лечения злокачественной опухоли. Описаны клетки, которые продуцируют указанные антитела, нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую и легкую цепи антител или их вариабельные участки, а также векторы, содержащие указанную нуклеиновую кислоту.

**B1****037006****037006****B1**

### Ссылка на родственные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет согласно предварительным заявкам на патенты США № 62/008945 и № 62/082980 с названием "Антитела к индуцируемому глюкокортикоидами рецептору фактора некроза опухолей (GITR) и их применения", поданным 6 июня 2014 г. и 21 ноября 2014 г. соответственно, содержание которых включено посредством ссылки.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Индуцируемый глюкокортикоидами TNFR-подобный белок (GITR), костимулирующая молекула, также известная как TNFRSF18, AITR, CD357 и GITR-D, является членом семейства рецепторов TNF, первоначально идентифицированным в линиях мышиных Т-клеток, обработанных дексаметазоном (Nocentini et al., PNAS 1997;94:6216-21). Другие родственные члены семейства TNF-рецепторов включают CD40, CD27, 4-1BB и OX40. Хотя экспрессия GITR в наивных CD4+ и CD8+ клетках является низкой, он конститутивно экспрессируется в регуляторных Т-клетках (Tone et al., PNAS 2003;100:15059-64). Тем не менее, как только его экспрессия индуцируется на эффекторных Т-клетках, включение GITR стимулирует их активацию, пролиферацию и продукцию цитокинов (Watts, Annual Reviews in Immunology 2005;23:23-68). Что касается CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток (T<sub>reg</sub>), Shimizu сообщал, что включение GITR подавляет их функцию (Shimizu et al., Nature Immunology 2002;3:135-42) при использовании анализа супрессии в смешанной культуре. Тем не менее, в последующей работе Stephans et al. (JI 2004 15; 173(8):5008-20) определили, что включение GITR на Т-эффекторных (T<sub>eff</sub>) клетках придает им меньшую чувствительность к супрессии T<sub>reg</sub>, объясняя пониженную супрессию, наблюдаемую в совместных культурах T<sub>reg</sub>-T<sub>eff</sub> клеток. Антителоопосредованная стимуляция GITR DTA-1 (крысиным антителом к GITR мыши) способствует противоопухолевому иммунитету в многочисленных моделях опухолей.

GITR-L, лиганд для GITR, экспрессируется на низких уровнях в антигенпрезентирующих клетках (например, В-клетках, дендритных клетках), но его экспрессия временно повышается в этих клетках после активации, например, вирусной инфекцией (Suvas et al., J Virol. 2005; 79:11935-42).

С учетом постоянной потребности в улучшенных стратегиях для целенаправленного воздействия на заболевания, такие как злокачественная опухоль, благоприятные эффекты от усиленных иммунных реакций, в частности Т-клеточных реакций, новых средств и способов, которые модулируют активность GITR, являются очень желательными.

### Краткое описание настоящего изобретения

В настоящем документе представлены выделенные антитела, такие как моноклональные антитела, в частности человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с GITR и характеризуются желательными функциональными свойствами. Эти свойства включают в себя связывание с высокой аффинностью с человеческим GITR, связывание с обезьяньим GITR (например, с GITR яванского макака) и способность к стимуляции антигенспецифичных Т-клеточных реакций. Антитела, описанные в настоящем документе, можно применять для стимуляции антигенспецифичных Т-клеточных реакций, как, например, у субъекта-носителя опухоли или субъекта-носителя вируса (инфицированного вирусом), а также для выявления белка GITR в образце.

В соответствии с одним аспектом изобретения включает выделенные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с GITR и проявляют по меньшей мере одно из следующих свойств:

- (a) связываются с растворимым человеческим GITR;
- (b) связываются с мембраносвязанным человеческим GITR;
- (c) связываются с мембраносвязанным GITR яванского макака;
- (d) индуцируют или усиливают активацию Т-клеток, например антигенспецифичную активацию Т-клеток;
- (e) ингибируют связывание лиганда GITR с GITR на 3A9-hGITR клетках;
- (f) не более чем частично ингибируют связывание лиганда GITR с GITR на активированных Т-клетках;
- (g) связываются с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4);
- (h) связываются как с О-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR;
- (i) характеризуются агонистической активностью в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность; и
- (j) конкурируют в любом из направлений или в обоих направлениях с одним или несколькими из антител 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и 6G10 за связывание с человеческим GITR.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, стимулируют противоопухолевую иммунную реакцию, например антигенспецифичную Т-клеточную реакцию. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части повышают продукцию цитокинов (например, IL-2 и/или IFN- $\gamma$ ) в экспрессирующих GITR Т-клетках и/или повышают пролиферацию Т-клеток.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части не связываются с Fc-рецепторами. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части связываются с одним или несколькими Fc $\gamma$ R, например активирующими или ингибирующими Fc $\gamma$ R.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части связываются с растворимым человеческим GITR с K<sub>D</sub>, составляющей 10 нМ или менее при измерении с помощью метода Biotin, связываются с мембраносвязанным человеческим GITR с K<sub>D</sub>, составляющей 1 нМ или менее при измерении по Скэтчарду, связываются с мембраносвязанным человеческим GITR с EC<sub>50</sub>, составляющей 1 нМ или менее при измерении с помощью метода FACS, связываются с мембраносвязанным GITR яванского макака с EC<sub>50</sub>, составляющей 10 нМ или менее при измерении с помощью метода FACS, индуцируют или усиливают активацию Т-клеток, например T<sub>eff</sub>-клеток, не требуя перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур, ингибируют связывание лиганда GITR с GITR с EC<sub>50</sub>, составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS, и/или связываются с участками PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4).

Настоящее изобретение включает выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфично связываются с GITR и содержат три CDR варибельного участка тяжелой цепи и три CDR варибельного участка легкой цепи, которые находятся в парах из варибельного участка тяжелой цепи и варибельного участка легкой цепи, выбранных из:

(a) SEQ ID NO: 13 и 14. Настоящее изобретение включает выделенные моноклональные антитела, которые связываются с GITR и содержат:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно.

В настоящем документе описаны выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с GITR и содержат варибельные участки тяжелой и легкой цепей, причем варибельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

В настоящем документе описаны выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с GITR и содержат варибельные участки тяжелой и легкой цепей, причем варибельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В настоящем документе описаны выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с GITR и содержат последовательности варибельных участков тяжелой и легкой цепей, по меньшей мере на 85% идентичные, например на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичные, аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.

В соответствии с вариантами осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части (a) связываются с тем же эпитопом на GITR, что и 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и/или 6G10, и (b) ингибируют связывание 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и/или 6G10 с GITR на активированных Т-клетках по меньшей мере на 50, 60, 70, 80 или 90% при измерении, например, с помощью метода FACS.

В соответствии с вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части связываются с участками PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, связываются как с человеческим GITR, так и с GITR яванского макака.

В соответствии с вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части представляют собой антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианты. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части содержат Fc IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией, например Fc IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией со следующими мутациями: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части содержат Fc, связывающийся с активирующим Fc $\gamma$ R или характеризующийся усиленным связыванием с ним, например, в сравнении с Fc IgG1 дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления метиониновые остатки в CDR участках антител к GITR или их антигенсвязывающих частей заменены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислению. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR или их антигенсвязывающие части представляют собой человеческие или гуманизированные антитела.

В настоящем документе описаны выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с GITR, содержащие модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2 и по меньшей мере один из CH1, CH2 и CH3, который не относится к изолипу IgG2, причем антитело к GITR характеризуется повышенной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом к GITR, но с шарниром, не являющемся шарниром IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 223-226 и 283-290, или константный участок тяжелой цепи, который отличается от них не более чем 5 аминокислотами или является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 223-226 и 283-290.

В настоящем документе описаны биспецифичные молекулы, содержащие антитело к GITR, связанное с молекулой, которая характеризуется второй специфичностью связывания.

В настоящем документе описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельные участки тяжелой и/или легкой цепей антител к GITR или их антигенсвязывающих частей, векторы экспрессии, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, и клетки, трансформированные векторами экспрессии.

В настоящем документе описаны иммуноконъюгаты, содержащие антитела к GITR, описанные в настоящем документе, связанные со средством.

В настоящем документе описаны композиции, содержащие антитела к GITR или их антигенсвязывающие части и носитель. Также в настоящем документе предполагаются наборы, содержащие антитела к GITR или их антигенсвязывающие части и инструкции к применению.

В настоящем документе раскрыт способ получения антител к GITR, предусматривающий экспрессию антитела к GITR в клетке и выделение антитела из клетки.

В настоящем документе предлагается способ стимуляции антигенспецифичной Т-клеточной реакции, включающий раскрыт Т-клетки в контакт с антителом к GITR или его антигенсвязывающей частью таким образом, чтобы стимулировалась антигенспецифичная Т-клеточная реакция.

В настоящем документе раскрыт способ активации или костимуляции Т-клетки, например эффекторной Т-клетки, включающий приведение клетки, например эффекторной Т-клетки, в контакт с антителом к GITR или его антигенсвязывающей частью и CD3, причем эффекторная Т-клетка активируется или подвергается костимуляции.

В настоящем документе раскрыт способ повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в Т-клетке и/или повышения ее пролиферации, включающий приведение Т-клетки в контакт с эффективным количеством антитела к GITR или его антигенсвязывающей части.

В настоящем документе раскрыт способ повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в Т-клетках у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела к GITR или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или конъюгата, содержащих антитело к GITR, или композиции, содержащей антитело к GITR, для повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  из Т-клеток.

В настоящем документе раскрыт способ снижения или сокращения количества регуляторных Т-клеток в опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества антитела к GITR или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или конъюгата, причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуется эффекторной или усиленной эффекторной функцией, для снижения количества регуляторных Т-клеток в опухоли.

В настоящем документе раскрыт способ стимуляции иммунной реакции у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела к GITR или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или конъюгата субъекту таким образом, чтобы стимулировалась иммунная реакция у субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект имеет опухоль, а стимулируется иммунная реакция в отношении опухоли.

В настоящем документе раскрыт способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту антитела к GITR или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или конъюгата таким образом, чтобы ингибировался рост опухоли у субъекта.

В настоящем документе раскрыт способ лечения злокачественной опухоли, например, с помощью иммунотерапии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела к GITR или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или конъюгата, содержащих антитело к GITR, или композиции, содержащей антитело к GITR, для лечения злокачественной опухоли. В соответствии с определенными вариантами осуществления злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль матки/шейки матки, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опу-

холь легкого, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль из зародышевых клеток, злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль кожи, злокачественные новообразования центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому и злокачественную опухоль, связанную с вирусом. В соответствии с определенными вариантами осуществления злокачественная опухоль представляет собой метастазирующую злокачественную опухоль, невосприимчивую к лечению злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств с антителом к GITR, например антитела к PD1, антитела к LAG-3, антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-L1.

В настоящем документе предлагается способ выявления наличия GITR в образце, включающий приведение образца в контакт антителом к GITR или его антигенсвязывающей частью в условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом или его антигенсвязывающей частью и GITR, и выявление образования комплекса.

В настоящем документе предполагаются применения антител к GITR, описанных в настоящем документе, для лечения злокачественной опухоли, стимуляции иммунной реакции у субъекта, стимуляции антигенспецифичной Т-клеточной реакции, активации или костимуляции Т-клетки, повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в Т-клетке и/или повышения ее пролиферации, снижения или сокращения количества регуляторных Т-клеток в опухоли и/или ингибирования роста опухолевых клеток. Также в настоящем документе предполагаются применения антител к GITR, описанных в настоящем документе, для получения лекарственного препарата для стимуляции иммунной реакции у субъекта, стимуляции антигенспецифичной Т-клеточной реакции, активации или костимуляции Т-клетки, повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в Т-клетке и/или повышения ее пролиферации, снижения или сокращения количества регуляторных Т-клеток в опухоли и/или ингибирования роста опухолевых клеток.

Другие признаки и преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из нижеследующего подробного описания и примеров, которые не следует истолковывать как ограничивающие.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 приведены аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей моноклональных антител 28F3 (SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно), 18E10 (SEQ ID NO: 39 и 40 соответственно) и 19D3 (SEQ ID NO: 26 и 27 соответственно). CDR V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> в 28F3 подчеркнуты.

На фиг. 2А приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 147) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 13) переменного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 28F3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 20), CDR2 (SEQ ID NO: 21) и CDR3 (SEQ ID NO: 22) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 2В приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 148) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 14) переменного участка легкой каппа-цепи человеческого моноклонального антитела 28F3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 24) и CDR3 (SEQ ID NO: 25) выделены, а также указаны полученные элементы V и J зародышевой линии.

На фиг. 3А приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 158) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 39) переменного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 18E10. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 46), CDR2 (SEQ ID NO: 47) и CDR3 (SEQ ID NO: 48) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 3В приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 159) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 40) переменного участка легкой каппа-цепи человеческого моноклонального антитела 18E10. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO: 50) и CDR3 (SEQ ID NO: 51) выделены, а также указаны полученные элементы V и J зародышевой линии.

На фиг. 4А приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 154) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 26) переменного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 19D3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 33), CDR2 (SEQ ID NO: 34) и CDR3 (SEQ ID NO: 35) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 4В приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 155) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 27) переменного участка легкой каппа-цепи человеческого моноклонального антитела 19D3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 36), CDR2 (SEQ ID NO: 37) и CDR3 (SEQ ID NO: 38) выделены, а также указаны полученные элементы V и J зародышевой линии.

На фиг. 5А приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 162) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 52) переменного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 3С3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 62), CDR2 (SEQ ID NO: 63) и CDR3 (SEQ ID NO: 64) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 5В приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 163) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 53) переменного участка (VK1) легкой каппа-цепи человеческого моно-





шевой линии V<sub>к</sub> человека (SEQ ID NO: 213 и 214 соответственно).

На фиг. 30 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменных участков тяжелой цепи 6G10 (SEQ ID NO: 335) с аминокислотными последовательностями 3-33, 3-10 и JH6 зародышевой линии V<sub>H</sub> человека (SEQ ID NO: 192, 195 и 196 соответственно).

На фиг. 31 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменного участка (VK1) легкой цепи 6G10 (SEQ ID NO: 336) с аминокислотными последовательностями L18 и JK2 зародышевой линии V<sub>к</sub> человека (SEQ ID NO: 204 и 205 соответственно).

На фиг. 32 показана аффинность связывания (в нМ) у различных антител к GITR в отношении активированных человеческих Т-клеток, которую оценивали с помощью метода FACS, причем в качестве контролей использовали образец без антитела и образцы с антителами IgG1 и hIgG2.

На фиг. 33 показана аффинность связывания (в нМ) у различных антител к GITR в отношении активированных Т-клеток яванского макака, которую оценивали с помощью метода FACS, причем в качестве контролей использовали образец без антитела и образцы с антителами hIgG1 и hIgG2.

На фиг. 34А и 34В показана способность различных антител к GITR ингибировать связывание лиганда GITR (GITR-L) с GITR 3А9 клетками, причем в качестве контролей использовали образец с hIgG1, hIgG2, без антитела и только сами клетки.

На фиг. 34С показано связывание рекомбинантного GITR-L с активированными человеческими CD4 и CD8 Т-клетками.

На фиг. 34D показано, что GITR-L частично блокирует связывание 28F3-hIgG1 с активированными человеческими CD4+ Т-клетками. Связывание 28F3-hIgG1 в фиксированной концентрации, составляющей 0,5 мкг/мл, с активированными Т-клетками частично блокировалось предварительно связавшимся GITR-L с IC50, составляющей 0,0024 мкг/мл.

На фиг. 34Е показано, что 28F3-hIgG1 не блокирует связывание 0,6 мкг/мл GITR-L с активированными человеческими Т-клетками. Когда GITR-L добавляли к CD4+ Т-клеткам в концентрации 0,6 мкг/мл, примерно 90% от насыщения, предварительно связавшееся 28F3-hIgG1 было неспособно блокировать GITR-L в диапазоне концентраций от 100 до 0,00056 мкг/мл.

На фиг. 34F показано, что 28F3-hIgG1 частично блокирует связывание 0,02 мкг/мл GITR-L с активированными человеческими Т-клетками. Связывание GITR-L в фиксированной концентрации, составляющей 20 нг/мл, с активированными Т-клетками частично блокировалось предварительно связавшимся 28F3-hIgG1 с IC50, составляющей 0,075 мкг/мл.

На фиг. 35А показан результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий, что антитело к GITR 28F3 связывается с нативным, а не с денатурированным человеческим GITR, и что на связывание не оказывает воздействие наличие или отсутствие N-связанного гликозилирования. Знаком "+" обозначены образцы, обработанные PNGase F для удаления N-связанного гликозилирования.

Фиг. 35В представляет собой изображение окрашенного кумасси синим геля, показывающее наличие всех форм человеческого GITR перед переносом на нитроцеллюлозу для вестерн-блоттинг анализа.

На фиг. 36А-36В показано связывание антител 28F3 и 3С3 с фрагментами нативного GITR, полученных путем расщепления эндопротеиназой Arg-C (1), эндопротеиназой Lys-C (2), трипсином (3), эндопротеиназой Glu-C (4) или эндопротеиназой Asp-N (5).

На фиг. 37 показан вид в форме тепловой карты для антитела к GITR 28F3, связывающегося с пептидами-фрагментами человеческого GITR, полученными в результате расщепления нативного белка человеческого GITR с использованием эндопротеиназы Glu-C и трипсина ("Glu-C и трипсин"), эндопротеиназы Arg-C ("Arg-C"), эндопротеиназы Lys-C и трипсина ("Lys-C и трипсин"), трипсина или эндопротеиназы Asp-N и эндопротеиназы Glu-C ("AspN и GluC"), идентифицирующая положение эпитопа, с которым связывается антитело 28F3 (область в рамке). Аминокислотная последовательность зрелого внеклеточного домена человеческого GITR показана темно-серой, а последовательность мышинного Fc, связанная с ним через C-конец, показана светло-серой.

На фиг. 38А показаны пептиды в проточной фракции после инкубирования покрытых 28F3 бусин с пептидами, полученными в результате расщепления трипсином нативного человеческого GITR.

На фиг. 38В показаны два основных пептида, связывающиеся с 28F3 (указаны звездочкой).

На фиг. 38С показана идентификация с помощью LC-MS первого из двух пиков на фиг. 34В, который соответствует N-концевому пептиду, имеющему показанную последовательность и не имеющему O-связанного гликозилирования.

На фиг. 38D показана идентификация с помощью LC-MS второго из двух пиков на фиг. 34В, который соответствует N-концевому пептиду, имеющему показанную последовательность и не имеющему O-связанного гликозилирования в T20.

На фиг. 38Е показан пептид GITR, оставшийся после *in situ* расщепления эндопротеиназой Asp-N более длинного пептида, который инкубировали вместе с 28F3.

На фиг. 39А показан перечень полученных в результате расщепления пептидов для рекомбинантного человеческого GITR/Fc и белкового комплекса рекомбинантного человеческого GITR/Fc и 28F3 IgG1, достигающий 86% охвата последовательности для N-концевого участка GITR.

На фиг. 39В показаны уровни поглощения дейтерия при HDX-масс-спектрометрии (MS) в отсутст-

вие/при наличии mAb 28F3 IgG1 ("GITR.6").

На фиг. 39С изображены два участка в зрелом человеческом GITR, связываемые 28F3, которые определены с помощью HDX MS.

На фиг. 40 показаны эффекты различных агонистических антител к GITR в отношении секреции IL-2 3A9-hGITR клетками в присутствии связанных на планшете антител к CD3.

На фиг. 41А показаны эффекты агонистических антител к GITR 18E10, 13H2 (идентичных 28F3) и 28F3 в отношении секреции IL-2 3A9-hGITR клетками, активированными специфическим антигеном.

На фиг. 41В показаны эффекты агонистических антител к GITR 3С3 (показаны как "GITR.3"), 28F3, 19D3 и 18E10 в отношении секреции IL-2 3A9-hGITR клетками, активированными специфическим антигеном.

На фиг. 42А показаны эффекты различных агонистических HuMab антител к GITR в отношении секреции интерферона гамма (IFN- $\gamma$ ) Т-клетками, стимулируемыми с использованием СНО-ОКТ3 клеток (т.е. СНО клеток, экспрессирующих scfv ОКТ3).

На фиг. 42В показаны эффекты агонистического антитела к GITR 28F3 в отношении секреции IL-2 CD4<sup>+</sup> Т-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, где Т-клетки получены от первого донора.

На фиг. 42С показаны эффекты антитела к GITR 28F3 в отношении секреции IFN- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> Т-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, где Т-клетки получены от первого донора.

На фиг. 42D показаны эффекты антитела к GITR 28F3 в отношении секреции IL-2 CD4<sup>+</sup> Т-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, где Т-клетки получены от второго донора.

На фиг. 42Е показаны эффекты антитела к GITR 28F3 в отношении секреции IFN- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> Т-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, где Т-клетки получены от второго донора.

На фиг. 43 показаны эффекты антитела к GITR 28F3 (IgG2), 28F3-F(ab')<sub>2</sub> фрагмента и 28F3-Fab в отношении секреции IL-2 3A9-hGITR клетками, стимулируемыми LK35.2 клетками в присутствии пептида HEL48-63.

На фиг. 44 показаны результаты иммуногистохимического анализа образцов человеческих миндалин с использованием моноклонального антитела 28F3-FITC.

На фиг. 45А-45D показаны эффекты различных изотипов крысиного антитела к GITR мыши, DTA-1, в отношении противоопухолевой активности, измеренные на основании изменений объема опухолей у отдельных мышей, обработанных этими изотипами в модели аденокарциномы толстой кишки MC38: (фиг. 45А) контрольное мышье антитело IgG1 (10 мг/кг); (фиг. 45В) крысиное DTA-1 IgG2b (10 мг/кг); (фиг. 45С) мышье DTA-1 IgG1 (10 мг/кг); (фиг. 45D) мышье DTA-1 IgG2a (10 мг/кг). Количество мышей, у которых отсутствовала опухоль (TF), на группу показано для каждой группы из 10 мышей.

На фиг. 46А и 46В показаны изменения среднего (фиг. 46А) и медианного объемов опухоли (фиг. 46В) для опухолей MC38 в группах мышей, обработанных антителами DTA-1 (10 мг/кг) разных изотипов.

На фиг. 47А-47F показан проточно-цитометрический анализ селезенок (фиг. 47А-47С) и опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) (фиг. 47D-47F) из мышей-носителей опухоли MC38, обработанных различными изотипами антитела к GITR (DTA-1) и антитела к CTLA-4 (9D9), а также указанным контрольным антителом: (фиг. 47А) процент CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке; (фиг. 47В) процент CD4<sup>+</sup> клеток в селезенке; (фиг. 47С) процент CD4<sup>+</sup> клеток, которые также являются Foxp3<sup>+</sup>, в селезенке; (фиг. 47D) процент CD8<sup>+</sup> Т-клеток в TIL; (фиг. 47Е) процент CD4<sup>+</sup> клеток в TIL; (фиг. 47F) процент CD4<sup>+</sup> клеток, которые также являются Foxp3<sup>+</sup>, в TIL.

На фиг. 48А-48F показаны эффекты различных изотипов крысиного антитела к GITR мыши, DTA-1, подвергнутого повторному конструированию для сведения к минимуму агрегации (называемого "mGITR.7"), в отношении противоопухолевой активности, которую измеряют по изменениям объемов опухолей у отдельных мышей, обработанных этими изотипами в модели MC38: (фиг. 48А) контрольное мышье антитело IgG1; (фиг. 48В) mGITR.7 mIgG1; (фиг. 48С) mGITR.7 mIgG1-D265A; (фиг. 48D) mGITR.7 mIgG2a; (фиг. 48Е) mGITR.7 mIgG2b; (фиг. 48F) крысиное mGITR.7 IgG2b. Количество TF мышей на группу показано для каждой группы из 9 мышей.

На фиг. 49А и 49В показаны изменения среднего (фиг. 49А) и медианного объемов опухоли (фиг. 49В) для опухолей MC38 в группах мышей, обработанных повторно сконструированными антителами DTA-1 разных изотипов.

На фиг. 50А и 50В показан проточно-цитометрический анализ эффектов разных изотипов DTA-1 (повторно сконструированного "mGITR" антитела DTA-1 или первоначально сконструированного "DTA-1" антитела) и изотипов антитела к CTLA-4 (9D9) в отношении Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> в селезенках (фиг. 50А) и TIL (фиг. 50В) из мышей-носителей опухоли MC38.

На фиг. 51А-51Е показана противоопухолевая активность разных изотипов мышье DTA-1 в мышье модели фибросаркомы Sa1N, которую измеряют по изменениям объемов опухолей у отдель-

ных мышей, обработанных этими изотипами: (фиг. 51A) контрольное мышинное антитело IgG1; (фиг. 51B) мышинное DTA-1 IgG2a; (фиг. 51C) крысиное DTA-1 IgG2b; (фиг. 51D) мышинное DTA-1 IgG1; (фиг. 51E) DTA-1 мышинное IgG1-D265A. Количество TF мышей на группу показано для каждой группы до 9 мышей.

На фиг. 52A и 52B показаны изменения среднего (фиг. 52A) и медианного объемов опухоли (фиг. 52B) для опухолей Sa1N в группах мышей, обработанных антителами DTA-1 разных изотипов.

На фиг. 53A и 53B показаны эффекты разных изотипов DTA-1 и изотипов антитела к CTLA-4 (9D9) в отношении Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> в селезенках (фиг. 53A) и TIL (фиг. 53B) из мышей-носителей опухоли Sa1N.

На фиг. 54A-54D показаны эффекты крысиного антитела к GITR, DTA-1, в отношении объема опухоли при использовании стадийной модели аденокарциномы толстой кишки MC38. Мышей обрабатывали (фиг. 54A) контрольным mIgG1, (фиг. 54B) mIgG + DTA-1, (фиг. 54C) mIgG + PD-1 и (фиг. 54D) PD-1 + DTA-1 на 7, 10 и 14 день. Количество мышей, у которых отсутствовала опухоль (TF), на группу показано для каждой группы из 10 мышей.

На фиг. 55A и 55B показано влияние различных комбинаций мутаций в CDR3 V<sub>H</sub> в антителе к GITR 28F3 на связывание с 3A9-hGITR клетками.

На фиг. 56A-56F показано влияние различных комбинаций мутаций в CDR3 V<sub>H</sub> в антителе к GITR 28F3 на уровень секреции IL-2 из 3A9-hGITR клеток в присутствии связанных на планшете антител к CD3.

На фиг. 57 показана аффинность связывания указанных антител к GITR в отношении активированных Т-клеток. Исследуемые антитела содержали один из следующих константных участков тяжелой цепи: константный участок IgG1 ("anti-GITRg1f"), константный участок IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией ("anti-GITR.g1.1f"), константный участок IgG2 ("anti-GITR-G2"), шарнир IgG2 и Fc-домен IgG1 ("anti-GITR.G2.G1f"), а также шарнир IgG2 и Fc-домен IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией ("anti-GITR.G2.G1.1f").

На фиг. 58A-58C показана секреция IFN-γ и IL-2 из донорских CD4 Т-клеток, стимулируемых растворимыми антителами к GITR человека с разными константными участками тяжелой цепи. На фиг. 58A показана секреция IFN-γ из донорских CD4 Т-клеток, стимулируемых экспрессирующими ОКТ3 CHO клетками и различными концентрациями антител к GITR человека с константным участком IgG2-IgG1. На фиг. 58B показана секреция IL-2 из донорских CD4 Т-клеток, стимулируемых экспрессирующими ОКТ3 CHO клетками и различными концентрациями константного домена тяжелой цепи IgG1 или гибридного константного домена тяжелой цепи IgG2-IgG1. На фиг. 58C показана секреция IL-2 из донорских CD4 Т-клеток, стимулируемых экспрессирующими ОКТ3 CHO клетками и различными концентрациями вариантов с отсутствующей эффекторной функцией (IgG1.1) антител на фиг. 55A и B.

На фиг. 59 показано сравнение указанных антител к GITR по критерию секреции IL-2 из 3A9-hGITR клеток в присутствии связанных на планшете антител к CD3.

На фиг. 60A-60D показан эффект 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1 в отношении пролиферации T<sub>reg</sub> и T<sub>eff</sub> клеток.

На фиг. 61A-61F показан эффект 28F3.IgG1 ("GITR.6IgG1") и 28F3.IgG1.1 ("GITR.6IgG1.1") в отношении индуцируемого NK-клетками лизиса активированных CD4<sup>+</sup> клеток, CD8<sup>+</sup> клеток и обогащенных T<sub>reg</sub> клеток от двух разных доноров.

На фиг. 62A-62C показан эффект контрольного антитела hIgG1, 28F3.IgG1 ("anti-GITR IgG1") и 28F3.IgG1.1 ("anti-GITR IgG1.1") в отношении роста опухолей MC38.

На фиг. 63A и 63B показаны соответственно средний объем и медианный объем опухолей MC38 у мышей, обработанных контрольным антителом hIgG1, 28F3.IgG1 ("anti-GITR IgG1") и 28F3.IgG1.1 ("anti-GITR IgG1.1").

На фиг. 64A и 64B показаны соответственно среднее изменение массы тела в % и медианное изменение массы тела в % у мышей с опухолями MC38, обработанных контрольным антителом hIgG1, 28F3.IgG1 ("anti-GITR IgG1") и 28F3.IgG1.1 ("anti-GITR IgG1.1").

На фиг. 65 показаны эффекты 28F3.IgG1 ("GITR IgG1") в сравнении с изотипическим контролем в отношении сокращения количества T<sub>reg</sub> клеток в модели опухоли MC38.

На фиг. 66 показаны эффекты 28F3.IgG1 ("GITR IgG1") в сравнении с изотипическим контролем в отношении процентного содержания CD8<sup>+</sup> Т-клеток в модели опухоли MC38.

На фиг. 67 показан эффект растворимого и подвергнутого перекрестному сшиванию 28F3.IgG1 ("GITR.6IgG1") и 28F3.IgG1.1 ("GITR.6IgG1.1") в отношении секреции IFN-γ из Т-клеток при совместном культивировании с CHO-ОКТ3 и CHO-ОКТ3-CD32a клетками.

На фиг. 68 показан эффект растворимого и подвергнутого перекрестному сшиванию 28F3.IgG1 ("GITR.6IgG1") и 28F3.IgG1.1 ("GITR.6IgG1.1") в отношении пролиферации Т-клеток при совместном культивировании с CHO-ОКТ3 и CHO-ОКТ3-CD32a клетками.

#### **Подробное описание настоящего изобретения**

В настоящем документе описаны выделенные антитела, в особенности, моноклональные антитела,

например человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с GITR и тем самым активируют дальнейшую передачу сигнала GITR ("агонистические антитела к GITR"). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, описанные в настоящем документе, полученные из конкретных последовательностей зародышевой линии для тяжелой и легкой цепей и/или содержат конкретные структурные признаки, такие как CDR участки, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. В настоящем документе предполагаются выделенные антитела, способы получения таких антител, иммуноконъюгаты и биспецифичные молекулы, содержащие такие антитела, а также фармацевтические композиции, составленные таким образом, чтобы они содержали антитела. Также в настоящем документе предполагаются способы применения антител самих по себе или в комбинации с другими иммуностимулирующими средствами (например, антителами) для усиления иммунных реакций и/или терапии злокачественной опухоли. Соответственно антитела к GITR, описанные в настоящем документе, можно применять при лечении в широком спектре терапевтических применений, в том числе, например, для ингибирования опухолевого роста и лечения вирусных инфекций.

Определения.

Для того чтобы настоящее описание можно было легче понять, в первую очередь определены некоторые термины. Дополнительные определения изложены в подробном описании.

Используемы в настоящем документе термин "индуцируемый глюкокортикоидами TNF-рецептор" или "GITR" относится к рецептору, который является членом суперсемейства TNF-рецепторов, который связывается с лигандом GITR (GITR-L). GITR также называется 18 членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF18), AITR и CD357. Термин "GITR" включает в себя любые варианты или изоформы GITR, которые экспрессируются клетками в естественных условиях. Соответственно антитела, описанные в настоящем документе, могут давать перекрестную реакцию с GITR из вида, отличного от человека (например, GITR яванского макака). В качестве альтернативы антитела могут быть специфичными в отношении человеческого GITR и могут не проявлять какой-либо перекрестной реактивности с другими видами. GITR или любые его варианты и изоформы можно либо выделить из клеток или тканей, которые экспрессируют их в естественных условиях, или их можно получить с помощью методов на основе рекомбинации с использованием широко известных методик из уровня техники и/или описанных в настоящем документе.

Были идентифицированы три изоформы человеческого GITR, все из которых имеют одинаковый внеклеточный домен, за исключением его С-концевой части. Вариант 1 (номер доступа NP\_004186; SEQ ID NO: 1) состоит из 241 аминокислоты и представляет собой наиболее длинный транскрипт. Он содержит дополнительный кодирующий сегмент, который приводит к сдвигу рамки по сравнению с вариантом 2. Образующийся в результате белок (изоформа 1) содержит отличающийся и более короткий С-конец по сравнению с изоформой 2. Вариант 2 (номер доступа NP\_683699; SEQ ID NO: 2) кодирует наиболее длинный белок (изоформа 2), состоящий из 255 аминокислот, и является растворимой. Вариант 3 (номер доступа NP\_683700; SEQ ID NO: 3) содержит дополнительный кодирующий сегмент, который приводит к сдвигу рамки по сравнению с вариантом 2. Образующийся в результате белок (изоформа 3) содержит отличающийся и более короткий С-конец по сравнению с изоформой 2 и состоит из 234 аминокислот.

Ниже приведены аминокислотные последовательности трех известных изоформ человеческого GITR, GITR яванского макака и GITR-L.

Изоформа 1 человеческого GITR (номер доступа NP\_004186; SEQ ID NO: 1; кодируемая нуклеотидной последовательностью с номером доступа NM\_004195.2):

```
MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHT
TRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCI
DCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFGFLTVFPGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWLTVVLL
AVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQPPEEERGERSA
EEKGRLGDLWV
```

Изоформа 2 человеческого GITR (номер доступа NP\_683699.1; SEQ ID NO: 2; кодируемая нуклеотидной последовательностью с номером доступа NM\_148901.1):

```
MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHT
TRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCI
DCASGTFSGGHEGHCKPWTDCWRCRRRPKTPEAASSPRKSGASDRRRRGGWETCG
CEPGRPPGPTAASPSGAPQAAGALRSALGRALLPWQKQWVQEGGSDQRPGCCSAA
AAGPCRRERETQSWPPSSLAGPDGVS
```

Изоформа 3 человеческого GITR (номер доступа NP\_683700.1; SEQ ID NO: 3; кодируемая нуклеотидной последовательностью с номером доступа NM\_148902.1):

```
MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHT
TRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCI
DCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFGFLTVFPGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWLTVVLL
AVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRKTQLLLEVPSTEDARSCQPPEEERGERSAEKGRGLG
DLWV
```

Сигнальная последовательность у изоформ 1-3 соответствует аминокислотам 1-25. Следовательно,

зрелые изоформы 1, 2 и 3 состоят из аминокислот с 26 по 241, 255 или 234 соответственно. Внеклеточный домен зрелого GITR состоит из аминокислот 26-162 и имеет аминокислотную последовательность:

```
QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEF
HCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFCIDCASGTFSGGHGHCKPWTDCTQFG
FLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEP (SEQ ID NO: 4)
```

Последовательность белка GITR яванского макака (SEQ ID NO: 5):

```
MCASGTLCLALLCAASLGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHPTTRCCRD
YQGECCSEWDCVCVQPEFHCGNPGCTTCQHHPCPSGQGVQPQGKFSFGFRCVDCALG
TFSRGHGDHCKPWTDCQFGFLTVFPGNKTHNAVCPGSPPAEPPGWLTIILLAVAACV
LLLSAQLGLHIWQLRSQPTGPRETQLLLEVPSTEDASSCQFPEEERGERLAEKGRGLG
DLWV
```

Последовательность белка человеческого GITR-L (номер доступа NP\_005083.2; SEQ ID NO: 6):

```
MTLHPSPTCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRQTQGAQRSSWKLWLFCSIVML
LFLCSFSWLFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLY
LIYGVQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDITDLFNS
EHQVLKNNYWGILLANPQFIS
```

Используемый в настоящем документе термин "антитело" включает в себя целые антитела и любые их антигенсвязывающие фрагменты (т.е. "антигенсвязывающие части") или отдельные цепи. В соответствии с одним вариантом осуществления "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (обозначаемого в настоящем документе сокращением  $V_H$ ) и константного участка тяжелой цепи. В определенных встречающихся в естественных условиях антителах константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. В определенных встречающихся в естественных условиях антителах каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи (обозначаемого в настоящем документе сокращением  $V_L$ ) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, CL.  $V_H$  и  $V_L$  участки можно дополнительно подразделить на участки с гипервариабельностью, называемые гипервариабельными участками (CDR), чередующиеся с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждый  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные участки тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Антитела, как правило, специфично связываются со своим когнатным антигеном с высокой аффинностью, что отражается отражаемой константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей от  $10^{-5}$  до  $10^{-11}$  М или менее. Любая  $K_D$ , большая чем приблизительно  $10^{-4}$  М, как обычно считается, указывает на неспецифическое связывание. Как используется в настоящем документе, антитело, которое "специфично связывается" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и практически идентичными антигенами с высокой аффинностью, это означает, что оно характеризуется  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее, предпочтительно  $10^{-8}$  М или менее, еще более предпочтительно  $5 \times 10^{-9}$  М или менее и наиболее предпочтительно от  $10^{-8}$  М до  $10^{-10}$  М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "практически идентичным" заданному антигену, если он проявляет высокий уровень идентичности последовательности с заданным антигеном, например, если его последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97% или еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична последовательности заданного антигена. Например, антитело, которое специфично связывается с человеческим GITR, также может давать перекрестные реакции с антигенами GITR из других видов приматов (например, GITR яванского макака), но может не давать перекрестные реакции с антигенами GITR из других видов или с антигеном, отличным от GITR.

Иммуноглобулин может происходить из любого из общеизвестных изотипов, в том числе без ограничения IgA, секреторного IgA, IgG и IgM. Изотип IgG делится на подклассы у определенных видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR, описанные в настоящем документе, относятся к подтипу IgG1 или IgG2. Иммуноглобулины, например IgG1, существуют в виде нескольких аллотипов, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Например, "антитело" включает в себя как встречающиеся в естественных условиях, так и не встречающиеся в естественных условиях антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие антитела и антитела, отличные от человеческих; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела. Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специфич-

ному связыванию с антигеном (например, человеческим GITR). Такие "фрагменты" имеют длину, например, от приблизительно 8 до приблизительно 1500 аминокислот, подходящей является длина от приблизительно 8 до приблизительно 745 аминокислот, подходящей является длина от приблизительно 8 до приблизительно 300, например от приблизительно 8 до приблизительно 200 аминокислот или от приблизительно 10 до приблизительно 50 или 100 аминокислот. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антигенсвязывающая часть" антитела, например антитела к GITR, описанного в настоящем документе, включают в себя (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из  $V_L$ ,  $V_H$ , CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из  $V_H$  и CH1 доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из  $V_L$  и  $V_H$  доменов одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из  $V_H$  домена; и (vi) выделенный гипервариабельный участок (CDR) или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Более того, хотя два домена в Fv-фрагменте,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, их можно соединить синтетическим линкером с использованием методов на основе рекомбинации, что обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой  $V_L$  и  $V_H$  участки спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Эти фрагменты антитела получают с использованием традиционных методик, известных специалисту в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу в отношении полезности таким же образом, что и интактные антитела. Антигенсвязывающие части можно получить с помощью методик с использованием рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

"Биспецифичное" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две отличающиеся пары тяжелых/легких цепей и два отличающихся сайта связывания. Биспецифичные антитела можно получить с помощью ряда способов, в том числе слияния гибридом или связывания Fab'-фрагментов; см., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа, или к композиции антител, в которой все антитела проявляют одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Соответственно термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителу или композиции антител, которые проявляют одну специфичность связывания и которые имеют вариабельные и необязательные константные участки, происходящие из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. В соответствии с одним вариантом осуществления человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, которая включает в себя В-клетку, полученную из трансгенного животного, не относящегося к человеку, например трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает в себя все человеческие антитела, которые получены, экспрессируются, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по отношению к генам человеческих иммуноглобулинов, или из гибридомы, полученной из него, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, и (d) антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые затрагивают сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат вариабельные и константные участки, в которых используются конкретные последовательности зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов, кодируемые генами зародышевой линии, но включающие последующие перегруппировки и мутации, которые происходят, например, в ходе созревания антитела. Как известно из уровня техники (см., например, Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125), вариабельный участок содержит антигенсвязывающий домен, кодируемый различными генами, которые перегруппировываются с образованием антитела, специфичного к чужеродному антигену. Помимо перегруппировки, вариабельный участок может дополнительно модифицироваться за счет многочисленных изменений отдельных аминокислот (называемых соматической мутацией или гипермутацией), повышая аффинность антитела к чужеродному антигену. Константный участок будет меняться при дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключении изотипа). Таким образом, у подвергшихся перегруппировке и соматической мутации молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, последовательность может не быть идентичной последовательностям исходных молекул нуклеиновой

кислоты, но при этом они будут практически идентичными или подобными (т.е. идентичными по меньшей мере по 80%).

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, имеющему вариабельные участки, в которых как каркасные участки, так и CDR участки происходят из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Более того, если антитело содержит константный участок, константный участок также происходит из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов (например, мутации, вводимые посредством неспецифического или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или при соматической мутации *in vivo*). Тем не менее, не предполагается, что термин "человеческое антитело", используемый в настоящем документе, включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были пересажены на человеческие каркасные последовательности. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются синонимично.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все из аминокислот за пределами CDR доменов антитела, не являющегося человеческим, заменены соответствующими аминокислотами, происходящими из человеческих иммуноглобулинов. В соответствии с одним вариантом осуществления гуманизированной формы антитела, некоторые, большинство или все из аминокислот за пределами CDR доменов были заменены аминокислотами из человеческих иммуноглобулинов, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одного или нескольких CDR участков являются неизменными. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот являются допустимыми при условии, что они не нарушают способность антитела к связыванию с конкретным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, подобную специфичности исходного антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором вариабельные участки происходят из одного вида, а константные участки происходят из другого вида, такому как антитело, в котором вариабельные участки происходят из мышинного антитела, а константные участки происходят из человеческого антитела.

Используемый в настоящем документе "изотип" относится к классу антител (например, антителу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи.

"Аллотип" относится к встречающимся в естественных условиях вариантам в пределах группы с конкретным изотипом, причем данные варианты отличаются несколькими аминокислотами (см., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1). Антитела, описанные в настоящем документе, могут относиться к любому аллотипу. Как используется в настоящем документе, антитела, называемые изотипом "IgG1f" или "IgG1.1f" представляют собой IgG1, и антитела IgG1.1 с отсутствующей эффекторной функцией соответственно относятся к аллотипу "f", т.е. имеют 214R, 356E и 358M в соответствии с нумерацией аминокислот в антителе EU, как описано у Kabat, приведенные, например, в SEQ ID NO: 7 (см. подчеркнутые остатки в SEQ ID NO: 7 в табл. 11).

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное в отношении антигена" используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело", как предполагается, относится к антителу, которое практически не содержит других антител с отличающимися антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с GITR, практически не содержит антител, которые специфично связываются с антигенами, отличными от GITR). Выделенное антитело, которое специфично связывается с эпитопом GITR, тем не менее, может характеризоваться перекрестной реактивностью с другими белками GITR из отличающихся видов.

Как используется в настоящем документе, предполагается, что антитело, которое "ингибирует связывание GITR-L с GITR", относится к антителу, которое ингибирует связывание GITR-L с GITR, например, в анализах связывания с использованием 3A9-hGITR клеток, с EC50, составляющей приблизительно 1 мкг/мл или менее, как, например, приблизительно 0,9 мкг/мл или менее, приблизительно 0,85 мкг/мл или менее, приблизительно 0,8 мкг/мл или менее, приблизительно 0,75 мкг/мл или менее, приблизительно 0,7 мкг/мл или менее, приблизительно 0,65 мкг/мл или менее, приблизительно 0,6 мкг/мл или менее, приблизительно 0,55 мкг/мл или менее, приблизительно 0,5 мкг/мл или менее, приблизительно 0,45 мкг/мл или менее, приблизительно 0,4 мкг/мл или менее, приблизительно 0,35 мкг/мл или менее, приблизительно 0,3 мкг/мл или менее, приблизительно 0,25 мкг/мл или менее, приблизительно 0,2 мкг/мл или менее, приблизительно 0,15 мкг/мл или менее или приблизительно 0,1 мкг/мл или менее согласно методам, принятым в данной области техники, например анализы связывания на основе метода FACS, описанные в настоящем документе.

"Эффекторная функция" относится ко взаимодействию Fc-участка антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому явлению, которое является результатом такого взаимодействия. Иллю-

стративные "эффекторные функции" включают в себя связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP) и снижение количества рецептора на клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-участка со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела).

"Fc-рецептор" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-участком в иммуноглобулине. FcR, которые связываются с антителом IgG, включают в себя рецепторы семейства FcγR, в том числе аллельные варианты и полученные в ходе альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRIII и FcγRIV у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIAA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Различные свойства человеческих FcγR приведены в табл. 1. У большинства характерных типов эффекторных клеток коэкспрессируются один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIB, тогда как клетки-натуральные киллеры (NK) селективно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIAA у людей), а не ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством Fc-рецепторов человека и считается эквивалентным мышинному IgG2a относительно типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается.

Таблица 1

Свойства человеческих FcγR

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность в отношении человеческого IgG	Предпочтение к изотипу	Распространение в клетках
FcγRI	Не описаны	Высокая (K <sub>D</sub> ~10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
FcγRIIA	H131	Низкая-средняя	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIAA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	B-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

"Fc-участок" (участок кристаллизуемого фрагмента), или "Fc-домен", или "Fc" относится к C-концевому участку тяжелой цепи антитела, который опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе связывание с Fc-рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках), или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-участок содержит константный участок антитела, за исключением первого домена константного участка иммуноглобулина (например, CH1 или CL). У изотипов антител IgG, IgA и IgD Fc-участок содержит два идентичных белковых фрагмента, происходящих из второго (C<sub>H2</sub>) и третьего (C<sub>H3</sub>) константных доменов двух тяжелых цепей антитела; Fc-участки IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (C<sub>H</sub> домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG Fc-участок содержит иммуноглобулиновые домены Cy2 и Cy3 и шарнир между Cy1 и Cy2. Хотя границы Fc-участка тяжелой цепи иммуноглобулина могут изменяться, Fc-участок тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется отрезком от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до карбоксиконца тяжелой цепи, где нумерация соответствует нумерации аминокислот в антителе EU, как описано у Kabat. C<sub>H2</sub> домен Fc-участка человеческого IgG простирается от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, тогда как C<sub>H3</sub> домен расположен с C-концевой стороны C<sub>H2</sub> домена в Fc-участке, т.е. он простирается от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 в IgG. Как используется в настоящем документе, Fc-участок может представлять собой нативную последовательность Fc, в том числе любой аллотипический вариант, или вариант Fc (например, Fc, не встречающийся в естественных условиях). Fc также может относиться к этому участку при выделении или в случае полипептида Fc-содержащего белка, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-участок", также называемый "Fc-слитый белок" (например, антитело или иммуноадгезин).

"Fc-участок с нативной последовательностью" или "Fc с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, которая является идентичной аминокислотной последовательности Fc-участка, обнаруживаемого в природе. Человеческие Fc-участки с нативной последовательностью включают в себя Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG1; Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG2; Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG3 и Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG4, а также их варианты, встречающиеся в естественных условиях. Fc с нативной последовательностью включают в себя различ-

ные аллотипы Fc (см., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1).

"Шарнир", "шарнирный домен" или "шарнирный участок" или "шарнирный участок антитела" относится к домену в константном участке тяжелой цепи, который соединяет CH1 домен с CH2 доменом и включает в себя верхнюю, среднюю и нижнюю части шарнира (Roux et al. J. Immunol. 1998 161:4083). Шарнир обеспечивает изменяющиеся уровни гибкости между связывающими и эффекторными участками антитела, а также обеспечивает сайты для образования межмолекулярных дисульфидных связей между константными участками двух тяжелых цепей. Как используется в настоящем документе, шарнир начинается в Glu216 и заканчивается в Gly237 для всех изотипов IgG (Roux et al., 1998 J Immunol 161:4083). Последовательности шарниров дикого типа IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 приведены в табл. 2 и 9.

Таблица 2

Аминокислоты шарнирного участка				
Тип Ig	C-концевой C <sub>H</sub> 1*	Верхний шарнир	Средний шарнир	Нижний шарнир
IgG1	VDKRV	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGG
	(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 301)	(SEQ ID NO: 305)	(SEQ ID NO: 313)
IgG2	VDKTV	ERK	CCVECPPCP	APPVAG
	(SEQ ID NO: 300)		(SEQ ID NO: 306)	(SEQ ID NO: 314)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APELLGG
	(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 302)	(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub>	(SEQ ID NO: 313)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APELLGG
	(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 302)	(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>	(SEQ ID NO: 313)
IgG3 (17-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APELLGG
	(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 302)	(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>1</sub>	(SEQ ID NO: 313)
IgG3 (15-15-15)	VDKRV	EPKS	CDTPPPCPRCP	APELLGG
	(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 303)	(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>	(SEQ ID NO: 313)
IgG3 (15)	VDKRV	EPKS	CDTPPPCPRCP	APELLGG
	(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 303)	(SEQ ID NO: 311)	(SEQ ID NO: 313)
IgG4	VDKRV	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGG
	(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 304)	(SEQ ID NO: 312)	(SEQ ID NO: 313)

\* C-концевые аминокислотные последовательности CH1 доменов.

Термин "шарнир" включает в себя шарниры дикого типа (такие как изложенные в табл. 11), а также их варианты (например, шарниры, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные шарниры). Например, термин "шарнир IgG2" включает в себя шарнир дикого типа IgG2, который приведен в табл. 11, и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные варианты шарнира IgG2 включают в себя шарниры IgG2, в которых 1, 2, 3 или все 4 цистеина (C219, C220, C226 и C229) изменены на другую аминокислоту. В конкретном варианте осуществления IgG2 содержит замену C219S. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир представляет собой гибридный шарнир, который содержит последовательности по меньшей мере от двух изотипов. Например, шарнир может содержать верхний, средний или нижний шарнир от одного изотипа, а остальную часть шарнира от одного или нескольких других изотипов. Например, шарнир может представлять собой шарнир IgG2/IgG1 и может содержать, например, верхний и средний шарниры IgG2 и нижний шарнир IgG1. Шарнир может характеризоваться эффекторной функцией, или у него может отсутствовать эффекторная функция. Например, нижний шарнир IgG1 дикого типа обеспечивает эффекторную функцию.

Термин "CH1 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, связывающему вариabельный домен с шарниром в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, CH1 домен начинается в A118 и заканчивается в V215. Термин "CH1 домен" включает в себя CH1 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 278 для IgG1 и SEQ ID NO: 279 для IgG2; табл. 11), а также их варианты (например, CH1 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные CH1 домены). Например, термин "CH1 домен" включает в себя CH1 домены дикого типа и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные CH1 домены включают в себя CH1 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В настоящем документе предлагается модификации в CH1 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

Термин "CH2 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, связывающему шарнир с CH3 доменом в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, CH2 до-

мен начинается в P238 и заканчивается в K340. Термин "CH2 домен" включает в себя CH2 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 280 для IgG1 и SEQ ID NO: 297 для IgG2; табл. 11), а также их варианты (например, CH2 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные CH2 домены). Например, термин "CH2 домен" включает в себя CH2 домены дикого типа и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные CH2 домены включают в себя CH2 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH2 домен содержит замены A330S/P331S, которые снижают эффекторную функцию. В настоящем документе предлагаются другие модификации в CH2 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

Термин "CH3 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, который является C-концевым относительно CH2 домена в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, CH3 домен начинается в G341 и заканчивается в K447. Термин "CH3 домен" включает в себя CH3 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 282 для IgG1 и SEQ ID NO: 298 для IgG2; табл. 11), а также их варианты (например, CH3 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные CH3 домены). Например, термин "CH3 домен" включает в себя CH3 домены дикого типа и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные CH3 домены включают в себя CH3 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В настоящем документе предлагается модификации в CH3 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

"Fc-участок с нативной последовательностью" или "Fc с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, которая является идентичной аминокислотной последовательности Fc-участка, обнаруживаемого в природе. Человеческие Fc-участки с нативной последовательностью включают в себя Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG1; Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG2; Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG3 и Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG4, а также их варианты, встречающиеся в естественных условиях. Fc с нативной последовательностью включает в себя различные аллотипы Fc (см., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1).

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, GITR), с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот (обычно линейный эпитоп) или несмежных аминокислот, располагающихся рядом при свертывании белка в третичную структуру (обычно конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при свертывании в третичную структуру, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связываются заданным антителом (т.е. картирования эпитопов), являются широко известными в уровне техники и включают, например, анализы с использованием иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из GITR) исследуют в отношении способности реагировать с заданным антителом (например, антителом к GITR). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают в себя методики из уровня техники, а также методики, описанные в настоящем документе, например рентгеноструктурную кристаллографию, 2-мерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "картирование эпитопов" относится к процессу идентификации молекулярных детерминант распознавания антигена антителом.

Термин "связываются с одним тем же эпитопом" в отношении двух или более антител означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом из аминокислотных остатков при определении помощью заданного метода. Методики определения того, связываются ли антитела с "тем же эпитопом на GITR", что и антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурные анализы кристаллов комплексов антиген-антитело, обеспечивающие разрешение эпитопа в атомном масштабе, и масс-спектрометрии с использованием водородно/дейтериевого обмена (HDX-MS). В других методах отслеживается связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, причем потерю связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считают показателем компонента эпитопа. Кроме того, для картирования эпитопов также можно применять вычислительные комбинаторные методы. Эти методы основываются на способности антитела, представляющего интерес, выделять на основе аффинности специфичные короткие пептиды из комбинаторных пептидных библиотек с использованием фагового дисплея. Предполагается, что антитела, имеющие одинаковые последовательности  $V_H$  и  $V_L$  или одинаковые последовательности CDR1, 2 и 3, связываются с одним и тем же эпито-

пом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е. ингибирует ли одно антитело связывание другого антитела с мишенью, и в какой мере оно это связывание ингибирует, можно определить с использованием известных конкурентных экспериментов. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может отличаться в зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом" (т.е. "холодным" антителом, которое вначале инкубируют с мишенью). Конкурентные анализы можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277; или в главе 11 в "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или со смежными эпитопами (например, что подтверждается стерическим несоответствием).

Другие конкурентные анализы связывания включают в себя: прямой или непрямой твердофазный радиоиммунологический анализ (RIA), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см., Stahl et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); прямой твердофазный EIA с использованием пары биотин-авидин (см. Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см., Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный RIA анализ с прямым мечением, с использованием метки I-125 (см., Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); прямой твердофазный EIA с использованием пары биотин-авидин (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)) и RIA с прямым мечением. (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)).

Используемые в настоящем документе термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфично связывается" относятся к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене. Как правило, антитело (i) связывается с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей примерно менее чем  $10^{-7}$  М, как, например, примерно менее чем  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М или еще ниже при определении, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на инструменте BIACORE 2000 с использованием предварительно определенного антигена, например рекомбинантного человеческого GITR, в качестве анализируемого вещества, а антитела в качестве лиганда или с помощью анализа по Скэтчарду связывания антитела с антиген-положительными клетками, и (ii) связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), отличающимся от предварительно определенного или близкородственного антигена. Соответственно антитело, которое "специфично связывается с человеческим GITR" относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клеткой человеческим GITR с  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее, как, например, примерно менее чем  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М или еще ниже. Антитело, которое "дает перекрестную реакцию с GITR яванского макака" относится к антителу, которое связывается с GITR яванского макака с  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее, как, например, примерно менее чем  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М или еще ниже. В соответствии с определенными вариантами осуществления у таких антител, которые не дают перекрестных реакций с GITR из вида, отличного от человека, проявляют такое связывание с этими белками, которое практически невозможно выявить в стандартных анализах связывания.

Термины " $k_{\text{ассоциации}}$ " или " $k_a$ ", используемые в настоящем документе, как предполагается, относятся к скорости ассоциации при взаимодействии конкретного антитела и антигена, тогда как предполагается, что термины " $k_{\text{диссоциации}}$ " или " $k_d$ ", используемые в настоящем документе, относятся к скорости диссоциации при взаимодействии конкретного антитела и антигена. Предполагается, что используемый в настоящем документе термин " $K_D$ " относится к константе диссоциации, которую получают из отношения  $k_d$  к  $k_a$  (т.е.  $k_d/k_a$ ) и которая выражена в виде молярной концентрации (М). Величины  $K_D$  для антител можно определить с использованием методов, общепринятых в данной области техники. Предпочтительным методом для определения  $K_D$  антитела является применение поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или точная цитометрия и анализ по Скэтчарду.

Используемый в настоящем документе термин "высокая аффинность" в отношении антитела IgG относится к антителу с  $K_D$ , составляющей  $10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно  $10^{-9}$  М или менее и еще более предпочтительно  $10^{-10}$  М или менее, в отношении целевого антигена. Тем не менее, связывание с "высокой аффинностью" может варьировать для других изотипов антител. Например, связывание с "высокой аффинностью" для изотипа IgM относится к антителу с  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее, более предпочтительно  $10^{-8}$  М или менее.

Термин "ЕС50" в контексте *in vitro* или *in vivo* анализа с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, кото-

рая индуцирует реакцию, которая составляет 50% от максимальной реакции, т.е. находится посередине между максимальной реакцией и фоновым уровнем.

Термин "связывается с иммобилизованным GITR" относится к способности описанного в настоящем документе антитела к связыванию с GITR, например, экспрессирующегося на поверхности клетки или прикрепленного к твердой подложке.

Используемый в настоящем документе термин "дает перекрестную реакцию" относится к способности описанного в настоящем документе антитела к связыванию с GITR из разных видов. Например, описанное в настоящем документе антитело, которое связывается с человеческим GITR, также может связываться с GITR из другого вида (например, GITR яванского макака). Как используется в настоящем документе, перекрестную реактивность можно измерить путем выявления способности специфично реагировать с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или по связыванию или иному функциональному взаимодействию с клетками, физиологически экспрессирующими GITR. Методы определения перекрестной реактивности включают в себя стандартные анализы связывания, которые описаны в настоящем документе, например анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore™ с использованием инструмента Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Уппсала, Швеция) или методики проточной цитометрии.

Используемый в настоящем документе термин "встречающийся в естественных условиях" применительно к объекту относится к тому факту, что объект может обнаруживаться в природе. Например, встречающейся в естественных условиях является последовательность полипептида или полинуклеотида, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории.

"Полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатков, при отсутствии верхнего предела в отношении длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как гликозилирование, фосфорилирование или образование дисульфидной связи, но не ограничиваясь ими. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Используемый в настоящем документе термин "молекула нуклеиновой кислоты", как предполагается, включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одонитевой или двунитевой и может представлять собой кДНК.

Также предполагаются "консервативные модификации последовательности" для последовательностей, изложенных в настоящем документе, например в табл. 11, как, например, в SEQ ID NO: 13-191, т.е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не нарушают связывание антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Такие консервативные модификации последовательности включают консервативные нуклеотидные и аминокислотные замены, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации можно вводить в последовательность в табл. 11, например SEQ ID NO: 13-191, с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают те, при которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком с подобной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с подобными боковыми цепями были определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, спрогнозированный несущественный аминокислотный остаток в антителе к GITR предпочтительно заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. Методы идентификации консервативных нуклеотидных и аминокислотных замен, которые не исключают связывание с антигеном, являются широко известными в уровне техники (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)). В качестве альтернативы в соответствии с другим вариантом осуществления мутации можно вводить произвольно по всей кодирующей последовательности антитела к GITR или ее части, как, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и полученные в результате антитела к GITR можно подвергать скринингу в отношении активности связывания.

Применительно к нуклеиновым кислотам термин "практическая гомология" указывает, что две нуклеиновые кислоты или их определенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, при соответствующих нуклеотидных вставках или делециях, по меньшей мере приблизительно на 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% нуклеотидов. В качестве альтернативы практическая гомология существует, когда сегменты будут гибридизироваться при условиях селективной гибридизации с последовательностью, комплементарной их нити.

Применительно к полипептидам термин "практическая гомология" указывает, что два полипептида или их определенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, при соответствующих аминокислотных вставках или делециях, по меньшей мере приблизительно на 80% аминокислот, обычно по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% аминокислот.

Процентная идентичность двух последовательностей зависит от числа идентичных положений, которые есть в обеих последовательностях (т.е. % гомологии = число идентичных положений/общее число положений  $\times$  100), принимая во внимание число гэпов и длину каждого гэпа, которые следует ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности двух последовательностей можно выполнить с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процентную идентичность двух нуклеотидных последовательностей можно определить с помощью программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте <http://www.gcg.com>) при использовании матрицы NWSgapdna.CMP, и штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80, и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процентную идентичность двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей также можно определить с помощью алгоритма по E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), при использовании таблицы веса остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Кроме того, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма по Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который бы включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте <http://www.gcg.com>), при использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Описанные в настоящем документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка также можно использовать в качестве "последовательности запроса" для проведения поиска в базах данных общего пользования, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов с помощью BLAST можно проводить с использованием программы NBLAST, вес = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем документе. Поиски белков с помощью BLAST можно проводить с использованием программы XBLAST, вес = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, описанным в настоящем документе. Для получения выравниваний с гэпами с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию в соответствующих программах (например, XBLAST и NBLAST); см., [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенном или практически чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "сделанной практически чистой", если она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, с помощью стандартных методик, в том числе щелочной обработки/обработки SDS (додецилсульфат натрия), центрифугирования в градиенте плотности CsCl, колоночной хроматографии, электрофореза в агарозном геле и других методик, широко известных в уровне техники; см., F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Нуклеиновые кислоты, например кДНК, могут быть подвергнуты мутации в соответствии со стандартными методиками с обеспечением генных последовательностей. В случае кодирующих последовательностей эти мутации могут воздействовать на аминокислотную последовательность, если это необходимо. В частности, предполагаются последовательности ДНК, практически гомологичные или происходящие из нативных V, D, J, константных, переключающих и других таких последовательностей, описанных в настоящем документе (причем "происходящий" указывает на то, что последовательность является идентичной другой последовательности или модифицированной из нее).

Предполагается, что используемый в настоящем документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к петле кольцевой двунитевой ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный генном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, векторы млекопитающих, не относящиеся к эписомальным) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и вследствие этого реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в на-

стоящем документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). В целом, векторы экспрессии, применимые в методиках с использованием рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее широко используемой формой вектора. Тем не менее, также включены все остальные формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые служат эквивалентным функциям.

Предполагается, что используемый в настоящем документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в естественных условиях присутствует в клетке, и, возможно, клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины, как предполагается, относятся не только к конкретной клетке субъекта, но также к потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях либо вследствие мутации, либо из-за воздействий окружающей среды, такое потомство, на самом деле, может не быть идентичным родительской клетке, но при этом все еще включено в объем используемого в настоящем документе термина "клетка-хозяин".

Используемый в настоящем документе термин "антиген" относится к любому натуральному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой GITR или его фрагмент. Антиген также может представлять собой опухолевый антиген, в отношении которого желательны защитные или терапевтические иммунные реакции, например антигены, экспрессируемые опухолевой клеткой (например, в вакцине в комбинации с антителом к GITR). Антигены включают в себя опухолеассоциированные антигены для предупреждения или лечения злокачественных опухолей. Примеры опухолеассоциированных антигенов включают без ограничения последовательности, содержащие все или часть из последовательностей антигенов  $\beta$ hCG, gp100 или Pmel17, HER2/neu, WT1, мезотелина, CEA, gp100, MART1, TRP-2, мелана-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), идиотипа, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, тирозиназы, теломеразы, SSX2 и MUC-1, а также и антигены, происходящие из герминогенных опухолей. Опухолеассоциированные антигены также включают антигены группы крови, например антигены Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. В качестве альтернативы в конструктор может быть включен более чем один антиген. Например, антиген MAGE можно комбинировать другими антигенами, такими как меланин A, тирозиназа и gp100, вместе с адьювантами, такими как GM-CSF или IL-12, и их можно связать с антителом к APC.

Последовательности вышеизложенных антигенов хорошо известны в уровне техники. Например, пример последовательности кДНК MAGE-3 приведен в патентном документе US 6235525 (Ludwig Institute for Cancer Research); примеры последовательностей нуклеиновой кислоты и белка NY-ESO-1 приведены в патентных документах US 5804381 и US 6069233 (Ludwig Institute for Cancer Research); примеры последовательностей нуклеиновой кислоты и белка мелан-A приведены в патентных документах US 5620886 и US 5854203 (Ludwig Institute for Cancer Research); примеры последовательностей нуклеиновой кислоты и белка NY-BR-1 приведены в патентных документах US 6774226 и US 6911529 (Ludwig Institute for Cancer Research) и примеры последовательностей нуклеиновой кислоты и белка NY-CO-58 приведены в патентном документе WO 02090986 (Ludwig Institute for Cancer Research); пример аминокислотной последовательности для белка HER-2/neu доступен в GENBANK® по номеру доступа AAA58637; а нуклеотидная последовательность (мРНК) для человеческого карциноэмбрионального антиген-подобного белка 1 (CEA-1) доступна в GENBANK® по номеру доступа NM020219.

"Иммунная реакция" относится к биологической реакции внутри позвоночного на чужеродные агенты, причем данная реакция защищает организм от этих агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунная реакция опосредуется действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, клетки-натурального киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (в том числе антитела, цитокины и компоненты комплемента), что приводит в результате к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночного проникших патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других ненормальных клеток, или, в случаях аутоиммунных реакций или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей. Иммунная реакция включает в себя, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например эффекторной Т-клетки или Th-клетки, такой как CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетка, или ингибирование T<sub>reg</sub> клетки.

"Иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к средству, например компоненту пути передачи сигнала, который может быть задействован в модуляции, регуляции или модификации иммунной реакции. "Модуляция", "регуляция" или "модификация" иммунной реакции относится к любому изменению в клетке иммунной системы или изменению активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, которые могут проявляться как повышение или снижение числа различных типов клеток, повышение или снижение

активности этих клеток или любые другие изменения, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых усиленно функционируют в опухолевом микроокружении. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клетки. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегуляторная мишень" представляет собой иммуномодулятор, на который оказывает целенаправленное воздействие связывание вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы и чья активность изменяется при таком связывании. Иммуномодулирующие мишени включают в себя, например, рецепторы на поверхности клетки ("иммуномодулирующие рецепторы") и лиганды рецепторов ("иммуномодулирующие лиганды").

"Иммунотерапия" относится к лечению субъекта, пораженного заболеванием, или имеющего риск заражения, или страдающему от рецидива заболевания, с помощью способа, предполагающего индукцию, усиление, подавление или иную модификацию иммунной реакции.

"Иммуностимулирующая терапия" или "иммуностимуляторная терапия" относится к терапии, результатом которой является повышение (индукция или усиление) иммунной реакции у субъекта, например, для лечения злокачественной опухоли.

"Усиление эндогенной иммунной реакции" означает повышение эффективности или силы существующей иммунной реакции у субъекта. Это повышение эффективности и силы может быть достигнуто, например, посредством преодоления механизмов, которые подавляют эндогенную иммунную реакцию хозяина, или посредством стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенную иммунную реакцию хозяина.

"Эффекторные Т-клетки" ("T<sub>eff</sub>") относятся к Т-клеткам (например, CD4+ и CD8+ Т-клеткам) с цитолитическими активностями, а также к Т-хелперам (T<sub>h</sub>) клеткам, которые секретируют цитокины, а также активируют другие иммунные клетки и управляют ими, но не включают регуляторные Т-клетки (T<sub>reg</sub> клетки). Описанные в настоящем документе антитела к GITR активируют T<sub>eff</sub> клетки, например CD4+ и CD8+ T<sub>eff</sub> клетки.

Повышенная способность к стимуляции иммунной реакции или иммунной системы может являться результатом усиленной агонистической активности костимулирующих Т-клеточных рецепторов и/или усиленной антагонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность к стимуляции иммунной реакции или иммунной системы может отражаться кратным повышением EC<sub>50</sub> или максимального уровня активности в анализе, в котором измеряют иммунную реакцию, например в анализе, в котором измеряют изменения высвобождения цитокинов или хемокинов, цитолитическую активность (определяемую непосредственно на клетках-мишенях или опосредованно через выявление CD107a или гранзимов) и пролиферацию. Способность к стимуляции иммунной реакции или активности иммунной системы может быть усилена по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется более сильной агонистической активностью по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированного константного участка тяжелой цепи. Усиленную агонистическую активность антитела можно определить, например, как показано в разделе "Примеры", например, путем измерения уровня секреции IFN- $\gamma$  или IL-2 из Т-клеток, которые приводят в контакт с антителом. Агонистическая активность может быть усилена по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более, что определяют по повышенному высвобождению цитокинов или повышенной пролиферации в эффекторных Т-клетках; пониженной активности регуляторных Т-клеток, если включение на T<sub>reg</sub> снижает функцию T<sub>reg</sub>; или по повышенному сокращению количества T<sub>reg</sub>. Например, количество IFN- $\gamma$  или IL-2, секретируемого Т-клеток, которые стимулируют антителом, содержащим модифицированный константный участок тяжелой цепи, может быть выше по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более, чем такое количество у Т-клеток, стимулируемых таким же антителом, которое не содержит модифицированного константного участка тяжелой цепи.

Используемый в настоящем документе термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. полученной путем слияния с использованием методов на основе рекомбинации). Такие связи можно получать с использованием широкого спектра методик, принятых в данной области техники, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантных белков.

Как используется в настоящем документе, "введение" относится к физическому введению субъекту композиции, содержащей терапевтическое средство, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные пути введения для антител, описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интраклеточную, интралимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутри-

сердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также *in vivo* электропорацию. В качестве альтернативы описанное в настоящем документе антитело можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, однократно, множество раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемый в настоящем документе термин "опосредованная Т-клетками реакция" относится к реакции, опосредованной Т-клетками, в том числе эффекторными Т-клетками (например, CD8<sup>+</sup> клетками) и хелперными Т-клетками (например, CD4<sup>+</sup> клетками). Опосредованные Т-клетками реакции включают, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию.

Используемый в настоящем документе термин "реакция цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)" относится к иммунной реакции, индуцируемой цитотоксическими Т-клетками. CTL-реакции преимущественно опосредуются CD8<sup>+</sup> Т-клетками.

Используемые в настоящем документе термины "ингибирует" или "блокирует" (например, в отношении ингибирования/блокирования связывания GITR-L с GITR на клетках) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к GITR ингибирует связывание GITR-L с GITR по меньшей мере приблизительно на 50%, например приблизительно на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%, что определено, например, как описано далее в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к GITR ингибирует связывание GITR-L с GITR не более чем на 50%, например приблизительно на 40, 30, 20, 10, 5 или 1%, что определено, например, как описано далее в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "ингибирует рост" опухоли включает в себя любое измеримое уменьшение роста опухоли, например ингибирование роста опухоли по меньшей мере приблизительно на 10%, например по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 99% или на 100%.

Как используется в настоящем документе, "злокачественная опухоль" относится к обширной группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток приводит в результате к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые внедряются в прилегающие ткани и могут метастазировать в удаленные части организма через лимфатическую систему или кровотоки.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "осуществлять лечение" и "лечение" относятся к любому типу вмешательства или процессу, осуществляемому с субъектом, или к введению субъекту активного средства с целью обеспечения регрессии, облегчения, ослабления, ингибирования, или замедления, или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или повторного проявления симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Лечение может подвергаться субъект, имеющий заболевание, или субъект, который не имеет заболевания (например, для профилактики).

"Гематологическая злокачественная опухоль" включает в себя лимфому, лейкоз, миелому или злокачественную опухоль из лимфоидной ткани, а также злокачественную опухоль селезенки и лимфатических узлов. Иллюстративные лимфомы включают как В-клеточные лимфомы (В-клеточный гемобластоз) и Т-клеточные лимфомы. В-клеточные лимфомы включают как лимфомы Ходжкина, так и большинство неходжкинских лимфом. Неограничивающие примеры В-клеточных лимфом включают в себя диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому ассоциированную со слизистой лимфоидной ткани, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (перекликается с хроническим лимфоцитарным лейкозом), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому Беркитта, средостенную В-крупноклеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, селезеночную лимфому из клеток краевой зоны, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфоидный гранулематоз. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают в себя внеузловую Т-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому кожи, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные опухоли также включают в себя лейкоз, такой как, без ограничения, вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелолейкоз и острый лимфобластный лейкоз. Гематологические злокачественные опухоли дополнительно включают в себя миеломы, такие как, без ограничения, множественная миелома и вялотекущая множественная миелома. Термином "гематологическая злокачественная опухоль" охватываются другие гематологические злокачественные опухоли и/или ассоциированные с В-клетками или Т-клетками злокачественные опухоли.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, подтверждаемой снижением тяжести симптомов заболевания, повышением частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждением ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием. Терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства включает в себя "профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективную дозу", которые представляют собой любое количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту, имеющему риск развития заболевания или риск подвергнуться рецидиву заболевания, ингибирует развитие или появление рецидива заболевания. Способность терапевтического средства содействовать регрессии заболевания или ингибировать развитие или появление рецидива заболевания можно оценить с использованием ряда способов, известных практикующему специалисту в данной области техники, как, например, в ходе клинических испытаний на субъектах-людях, в модельных системах на животных, прогнозирующих эффективность у людей, или путем анализа активности средства в *in vitro* анализах.

Например, противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое способствует регрессии злокачественной опухоли у субъекта. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии злокачественной опухоли до момента ликвидации злокачественной опухоли. "Способствует регрессии злокачественной опухоли" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства самого по себе или в комбинации с противоопухолевым средством приводит в результате к уменьшению опухолевого роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания, предупреждению ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием, или иному ослаблению симптомов заболевания у пациента. Кроме того, термины "эффективный" и "эффективность" в отношении лечения включает в себя как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на клеточном уровне, на уровне органа и/или организма (неблагоприятные эффекты), являющимся результатом введения лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или опухолевый рост по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% в сравнении с субъектами, не получавшими лечение. В соответствии с наиболее предпочтительными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или опухолевый рост, т.е. предпочтительно ингибирует рост клеток или опухолевый рост на 100%. Способность соединения к ингибированию опухолевого роста можно оценить с помощью анализов, описанных ниже. В качестве альтернативы это свойство композиции можно оценить путем исследования способности соединения к ингибированию роста клеток, такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных практикующему специалисту в данной области техники. В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, регрессию опухоли можно наблюдать, и она длится в течение периода по меньшей мере приблизительно 20 суток, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 суток или еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 суток.

Термин "пациент" включает в себя субъекта-человека и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" включает в себя любого человека или животное, отличное от человека. Например, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения субъекта, имеющего злокачественную опухоль. Термин "животное, отличное от человека," включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и позвоночных, не относящихся к млекопитающим, как, например, приматов, за исключением человека, овцу, собаку, корову, кур, амфибий, рептилий и т.д.

Используемые в настоящем документе термины "мкг" и "мкМ" используются взаимозаменяемо с "микрограмм" и "микромоль".

Описанные в настоящем документе различные аспекты описаны более подробно в следующих подразделах.

## I. Антитела к GITR.

В настоящем документе описаны антитела, например полностью человеческие антитела, которые характеризуются конкретными функциональными признаками или свойствами. Например, антитела специфично связываются с человеческим GITR. Кроме того, антитела могут давать перекрестную реакцию с GITR из одного или нескольких приматов, за исключением человека, таким как GITR яванского макака.

Помимо специфичного связывания с растворимым и/или мембраносвязанным человеческим GITR, описанные в настоящем документе антитела проявляют одно или несколько из следующих функциональных свойств:

- (a) связывание с GITR яванского макака;
- (b) стимуляция или усиление иммунной реакции;
- (c) активация Т-клеток (что подтверждается, например, повышенной секрецией цитокинов и/или пролиферацией);
- (d) ингибирование связывания GITRL с GITR на 3A9-hGITR клетках;
- (e) не более чем частичное ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на активированных Т-клетках;
- (f) связывание с конформационным эпитопом в N-концевой части человеческого GITR;
- (g) связывание как с гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR; и
- (h) наличие агонистической активности в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность.

Предпочтительно антитела к GITR связываются с GITR с высокой аффинностью, например с  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее,  $10^{-8}$  М или менее,  $10^{-9}$  М или менее,  $10^{-10}$  М или менее,  $10^{-11}$  М или менее,  $10^{-12}$  М или менее, от  $10^{-12}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-11}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-10}$  М до  $10^{-7}$  М или от  $10^{-9}$  М до  $10^{-7}$  М. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR связывается с растворимым человеческим GITR, например, при определении с помощью метода Вiasoge, с  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее,  $10^{-8}$  М или менее,  $10^{-9}$  М (1 нМ) или менее,  $10^{-10}$  М или менее, от  $10^{-12}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-11}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-10}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-7}$  М или от  $10^{-8}$  М до  $10^{-7}$  М. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR связывается со связанным (например, связанным с клеточной мембраной) человеческим GITR, как, например, на активированных человеческих Т-клетках, например, при определении с помощью проточной цитометрии и по графику Скэтчарда, с  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее,  $10^{-8}$  М или менее,  $10^{-9}$  М (1 нМ) или менее,  $10^{-10}$  М или менее, от  $10^{-12}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-11}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-10}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-11}$  М до  $10^{-9}$  М или от  $10^{-10}$  М до  $10^{-9}$  М. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR связывается с растворимым человеческим GITR с  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее,  $10^{-8}$  М или менее,  $10^{-9}$  М (1 нМ) или менее,  $10^{-10}$  М или менее, от  $10^{-12}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-11}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-10}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-7}$  М или от  $10^{-8}$  М до  $10^{-7}$  М, и со связанным с клеточной мембраной человеческим GITR с  $K_D$  или  $EC_{50}$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее,  $10^{-8}$  М или менее,  $10^{-9}$  М (1 нМ) или менее,  $10^{-10}$  М или менее, от  $10^{-12}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-11}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-10}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-11}$  М до  $10^{-9}$  М или от  $10^{-10}$  М до  $10^{-9}$  М.

Антитела к GITR могут связываться с GITR яванского макака, например связываются с мембраносвязанным GITR яванского макака, например с  $EC_{50}$ , составляющей 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, от 100 до 0,01 нМ, от 100 до 0,1 нМ, от 100 до 1 нМ или от 10 до 1 нМ, например, при измерении с помощью метода FACS (например, как описано в разделе "Примеры").

Антитела к GITR могут стимулировать или усиливать иммунную реакцию, например, активируя  $T_{eff}$  клетки, ограничивая супрессию эффекторных Т-клеток  $T_{reg}$  клетками, сокращая количество и/или ингибируя опухолевые  $T_{reg}$  клетки и/или активируя НК-клетки, например, в опухоли. Например, антитела к GITR могут активировать или костимулировать  $T_{eff}$  клетки, что подтверждается, например, повышенной секрецией цитокинов (например, IL-2 и IFN- $\gamma$ ) и/или усиленной пролиферацией. В соответствии с определенными вариантами осуществления также предлагается стимуляция CD3. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR повышает секрецию IL-2 на уровень 50, 100% (т.е. 2-кратно), 3-, 4-, 5-кратно или более, необязательно с максимумом до 10-, 30-, 100-кратного повышения при измерении, например, на первичных человеческих Т-клетках или Т-клетках, экспрессирующих человеческий GITR (например, как дополнительно описано в разделе "Примеры"). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR повышает секрецию IFN- $\gamma$  на уровень 50, 100% (т.е. 2-кратно), 3-, 4-, 5-кратно или более, необязательно с максимумом до 10-, 30-, 100-кратного повышения при измерении, например, на первичных человеческих Т-клетках или Т-клетках, экспрессирующих человеческий GITR (например, как дополнительно описано в разделе "Примеры").

Антитела к GITR могут ингибировать связывание человеческого GITRL с человеческим GITR на клетках, например 3A9 клетках, экспрессирующих человеческий GITR, например с EC<sub>50</sub>, составляющей 10 мкг/мл или менее, 1 мкг/мл или менее, от 0,01 до 10 мкг/мл, от 0,1 до 10 мкг/мл или от 0,1 до 1 мкг/мл (см. пример 5).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR не более чем только частично ингибируют связывание человеческого GITRL с человеческим GITR на клетках, например активированных Т-клетках (см. пример 5).

Антитела к GITR могут связываться с эпитопом, например с конформационным эпитопом в N-концевой части человеческого GITR, например с эпитопом, расположенным в пределах аминокислот 1-39 в зрелом человеческом GITR (см. пример 9), при определении, например, с помощью связывания антител с фрагментами человеческого GITR, например нативными (т.е. неденатурированными) фрагментами человеческого GITR. Антитела к GITR могут связываться с эпитопом, расположенным в пределах аминокислот 1-20 в зрелом человеческом GITR, при определении, например, с помощью связывания антител с фрагментами человеческого GITR, например нативными (т.е. неденатурированными) фрагментами человеческого GITR, с последующим ферментативным расщеплением или с помощью метода HDX (см. примеры 11 и 12 соответственно). Антитела к GITR могут связываться с эпитопом в пределах аминокислот 3-20 в зрелом человеческом GITR (PTGGPGCGPGRLLLGTGT, SEQ ID NO: 217). Антитела к GITR могут связываться с эпитопом в пределах аминокислот 3-20 и аминокислот 33-40 в зрелом человеческом GITR, т.е. с аминокислотными последовательностями PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR связываются как с гликозилированным, так и негликозилированным человеческим GITR. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR связываются с аминокислотными последовательностями PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) при определении с помощью метода HDX, например, с использованием протокола, изложенного в разделе "Примеры".

Антитела к GITR могут конкурировать за связывание с GITR (или ингибировать такое связывание) с антителами к GITR, содержащими CDR или вариabельные участки, описанные в настоящем документе, например 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR ингибируют связывание 28F3, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8, 19D3, 18E10 и/или 6G10 с человеческим GITR по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100%. В соответствии с определенными вариантами осуществления 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10 ингибируют связывание антител к GITR с человеческим GITR по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100%. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR ингибируют связывание 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10 с человеческим GITR по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100%, а 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10 ингибируют связывание антител к GITR с человеческим GITR по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100% (например, конкурируют в обоих направлениях).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR индуцируют или усиливают активацию Т-клеток, не требуя перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур, что определено, например, по отсутствию необходимости связывания с FcR. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR являются мультивалентными, например бивалентными. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR не являются моновалентными. В настоящем документе было показано, что F'(ab)<sub>2</sub>-фрагменты являются более эффективными, чем Fab-фрагменты при активации Т-клеток (см. раздел "Примеры").

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR не требуют перекрестного сшивания посредством Fc-рецепторов для своей агонистической активности, тем не менее, перекрестное сшивание с Fc-рецепторами усиливает их агонистическую активность в сравнении с таким же антителом, которое не связывается с Fc-рецепторами.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR характеризуются 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 из следующих признаков:

(1) связывание с растворимым человеческим GITR, например с K<sub>D</sub>, составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода Biacore;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с K<sub>D</sub>, составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении по Скэтчарду;

(3) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с EC<sub>50</sub>, составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении с помощью FACS;

(4) связывание с GITR яванского макака, например связывание с мембраносвязанным GITR яванского макака, например с EC<sub>50</sub>, составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода FACS;

(5) индукцию или усиление активации Т-клеток, как, например, при наличии включения CD3 (на-

пример, при наличии субоптимальных концентраций антитела к CD3), что подтверждается (i) повышенной продукцией IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в экспрессирующих GITR T-клетках и/или (ii) усиленной пролиферацией T-клеток;

(6) индукцию или усиление активации T-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур;

(7) наличие агонистической активности в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность;

(8) ингибирование связывания лиганда GITR с GITR, например, с EC<sub>50</sub>, составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS, например, в анализе с использованием 3A9-hGITR клеток;

(9) не более чем частичное ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на активированных T-клетках;

(10) связывание с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4), например с прерывающимся эпитопом в пределах аминокислотных последовательностей PTGG-PGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(11) связывание как с O-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR; и

(12) конкуренцию в любом из направлений или в обоих направлениях за связывание с человеческим GITR с 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10.

Антитела к GITR также могут индуцировать интернализацию GITR в активированных T-клетках, например в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клетках, например, в течение 10, 30 или 60 мин, и последующую передачу сигнала, например активацию (т.е. фосфорилирование) NF- $\kappa$ B p65 и MAP-киназы p38.

Соответственно будет понятно, что антитело, которое проявляет одно или несколько из этих функциональных свойств (например, биохимическую, иммунохимическую, клеточную, физиологическую или другие биологические активности или подобное) при определении в соответствии с методиками, известными в уровне техники и описанными в настоящем документе, связано со статистически значимым различием в конкретной активности, по сравнению с такой активностью, наблюдаемой в отсутствие антитела (например, или при наличии контрольного антитела с несоответствующей специфичностью). Предпочтительно индуцируемые антителом к GITR повышения измеряемого параметра (например, пролиферации T-клеток, продукции цитокинов) обеспечивают статистически значимое повышение измеряемого параметра по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100% (т.е. 2-кратно), 3-, 5- или 10-кратно, и в соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может повышать измеряемый параметр больше чем на 92, 94, 95, 97, 98, 99, 100% (т.е. 2-кратно), 3-, 5- или 10-кратно. И наоборот, индуцируемые антителом к GITR снижения измеряемого параметра (например, объема опухоли, связывания GITR-L с GITR, количества регуляторных T-клеток в опухолях) обеспечивают статистически значимое снижение измеряемого параметра по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%, и в соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может снижать измеряемый параметр больше чем на 92, 94, 95, 97, 98 или 99%.

Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител в отношении GITR у различных видов известны в уровне техники, в том числе, например, ELISA, вестерн-блоттинг и RIA. Подходящие анализы подробно описаны в разделе "Примеры". Кинетические характеристики связывания (например, аффинность связывания) для антител также можно оценить с помощью стандартных анализов, известных в уровне техники, как, например, с помощью анализа методом Вiasoge. Анализы для оценки эффектов антител в отношении функциональных свойств GITR (например, связывание лиганда, пролиферация T-клеток, продукция цитокинов) более подробно описаны ниже и в разделе "Примеры".

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR не являются нативными антителами или не являются антителами, встречающимися в естественных условиях. Например, антитела к GITR имеют посттрансляционные модификации, которые отличаются от таких модификаций у антител, встречающихся в естественных условиях, как, например, они имеют больше, меньше посттрансляционных модификаций или посттрансляционные модификации отличного типа.

## II. Иллюстративные антитела к GITR.

Конкретные антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой антитела, например моноклональное антитела, имеющие последовательности CDR и/или варибельного участка антител 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 и 6G10, выделенных и охарактеризованных в плане структуры, как описано в примере 1, а также антитела, по меньшей мере на 80% идентичные (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичные) последовательностям их варибельного участка или CDR. Аминокислотные последовательности V<sub>H</sub> 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 и 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 и 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 и 19H8-2) и 6G10 изложены в SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 и 335 соответственно. Аминокислотные последовательности V<sub>L</sub> 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3,

19H8-1, 19H8-2 и 6G10 приведены в SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 и 336 соответственно.

Соответственно в настоящем документе предполагаются выделенные антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 и 335.

Также предполагаются выделенные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 и 336.

В настоящем документе предполагаются выделенные антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащие:

(a) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно;

(b) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 26 и 27 соответственно;

(c) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 39 и 40 соответственно;

(d) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 52 и 53 соответственно;

(e) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 52 и 54 соответственно;

(f) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно;

(g) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 84 и 85 соответственно;

(h) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 97 и 98 соответственно;

(i) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 97 и 99 соответственно;

(j) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 115 и 116 соответственно;

(k) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 128 и 129 соответственно;

(l) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 128 и 130 соответственно; или

(m) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 335 и 336 соответственно.

Антитела к GITR могут содержать CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепей 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10 или их комбинации. Аминокислотные последовательности CDR1 V<sub>H</sub> у 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 и 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 и 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 и 19H8-2) и 6G10 изложены в SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 и 342 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V<sub>H</sub> у 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 и 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 и 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 и 19H8-2) и 6G10 изложены в SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 и 343 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V<sub>H</sub> у 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 и 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 и 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 и 19H8-2) и 6G10 изложены в SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 и 344. Аминокислотные последовательности CDR1 V<sub>L</sub> у 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10 изложены в SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 и 345 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V<sub>L</sub> у 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10 изложены в SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 и 346 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V<sub>L</sub> у 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10 изложены в SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 и 347 соответственно. CDR участки определены с использованием системы по Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

При условии, что каждое из этих антител связывается с GITR и что специфичность связывания антигена обеспечивается преимущественно CDR1, 2 и 3 участками, последовательности CDR1, 2 и 3 V<sub>H</sub> и последовательности CDR1, 2 и 3 V<sub>L</sub> могут быть "смешанными и подобранными" (т.е. CDR из разных антител можно смешивать и подбирать, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, 2 и 3 V<sub>H</sub> и CDR1, 2 и 3 V<sub>L</sub>) для создания других связывающихся с GITR молекул антител, описанных в настоящем документе. Связывание с GITR у таких "смешанных и подобранных" антител можно исследовать с использовани-

ем анализов связывания, описанных выше и в разделе "Примеры" (например, ELISA). Предпочтительно, если последовательности CDR  $V_H$  смешивают и подбирают, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности  $V_H$  заменяют подобной(подобными) в плане структуры последовательностью(последовательностями) CDR. Аналогично, если последовательности CDR  $V_L$  смешивают и подбирают, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности  $V_L$  предпочтительно заменяют подобной(подобными) в плане структуры последовательностью(последовательностями) CDR. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что новые последовательности  $V_H$  и  $V_L$  можно создать, заменяя одну или несколько последовательностей CDR участка  $V_H$  и/или  $V_L$  подобными в плане структуры последовательностями из последовательностей CDR, раскрытых в настоящем документе для моноклональных антител 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10.

В настоящем документе предполагаются выделенные антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащие:

- (a) CDR1 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 и 342;
  - (b) CDR2 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 и 343;
  - (c) CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 и 344;
  - (d) CDR1 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 и 345;
  - (e) CDR2 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 и 346; и
  - (f) CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 и 347;
- причем антитело специфично связывается с человеческим GITR.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело содержит варибельные участки тяжелой и легкой цепей, причем CDR1, CDR2 и CDR3 участки варибельного участка тяжелой цепи содержат:

- (a) SEQ ID NO: 20-22;
- (b) SEQ ID NO: 33-35;
- (c) SEQ ID NO: 46-48;
- (d) SEQ ID NO: 62-64;
- (e) SEQ ID NO: 78-80;
- (f) SEQ ID NO: 91-93;
- (g) SEQ ID NO: 106-108;
- (h) SEQ ID NO: 122-124;
- (i) SEQ ID NO: 138-140 или
- (j) SEQ ID NO: 342-344;

причем антитело специфично связывается с человеческим GITR.

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело содержит варибельные участки тяжелой и легкой цепей, причем CDR1, CDR2 и CDR3 участки варибельного участка легкой цепи содержат:

- (a) SEQ ID NO: 23-25;
- (b) SEQ ID NO: 36-38;
- (c) SEQ ID NO: 49-51;
- (d) SEQ ID NO: 65-67;
- (e) SEQ ID NO: 68-70;
- (f) SEQ ID NO: 81-83;
- (f) SEQ ID NO: 94-96;
- (g) SEQ ID NO: 109-111;
- (h) SEQ ID NO: 112-114;
- (i) SEQ ID NO: 125-127;
- (j) SEQ ID NO: 141-143;
- (k) SEQ ID NO: 144-146 или
- (l) SEQ ID NO: 345-347;

причем антитело специфично связывается с человеческим GITR.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитело содержит варибельные участки тяжелой и легкой цепей, в которых:

(a) CDR1, CDR2, и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 20-22 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 23-25 соответственно;

(b) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 33-35 соответ-

ственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 36-38 соответственно;

(c) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 46-48 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 49-51 соответственно;

(d) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 62-64 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 65-67 соответственно;

(e) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 62-64 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 68-70 соответственно;

(f) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 78-80 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 81-83 соответственно;

(g) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 91-93 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 94-96 соответственно;

(h) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 106-108 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 109-111 соответственно;

(i) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 106-108 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 112-114 соответственно;

(j) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 122-124 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 125-127 соответственно;

(k) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 138-140 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 141-143 соответственно;

(l) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 138-140 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 144-146 соответственно; или

(m) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 342-344 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 345-347 соответственно;

причем антигено специфично связывается с человеческим GITR.

$V_H$ -домен или один или несколько его CDR, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с константным доменом для образования тяжелой цепи, например полноразмерной тяжелой цепи. Аналогично,  $V_L$ -домен или один или несколько его CDR, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с константным доменом для образования легкой цепи, например полноразмерной легкой цепи. Полноразмерную тяжелую цепь (за исключением С-концевого лизина (K) или за исключением С-концевых глицина и лизина (GK), которые могут отсутствовать) и полноразмерную легкую цепь объединяют с образованием полноразмерного антитела.

$V_H$ -домен, описанный в настоящем документе, может быть слит с константным доменом человеческого IgG, например IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые являются либо встречающимися в естественных условиях, либо модифицированными, например, как описано далее в настоящем документе. Например,  $V_H$ -домен может содержать аминокислотную последовательность любого описанного в настоящем документе  $V_H$ -домена, слитую со следующими аминокислотными последовательностями человеческого IgG1:

```
ASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPCPAPE
LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSLSL SPG (SEQ ID NO: 7)
```

Константный домен человеческого IgG1 также может представлять собой константный домен аллотипического варианта. Например, аллотипический вариант IgG1 содержит R107K, E189D и M191L (подчеркнуты выше), а нумерация соответствует таковой в SEQ ID NO: 7). В пределах участка полноразмерной тяжелой цепи эти аминокислотные замены нумеруются R214K, E356D и M358L.

Описанный в настоящем документе  $V_L$ -домен может быть слит с константным доменом легкой каппа- или лямбда-цепи человека. Например,  $V_L$ -домен может содержать аминокислотную последовательность любого описанного в настоящем документе  $V_L$ -домена, слитую со следующими аминокислотными последовательностями легкой каппа-цепи человеческого IgG1:

RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY BREAKVQWKV DNALQSGNSQ

ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECS(EQ ID NO: 12)

В соответствии с определенными вариантами осуществления константный участок тяжелой цепи содержит лизин или другую аминокислоту на С-конце, например он содержит следующие концевые аминокислоты: LSPGK (SEQ ID NO: 220) для тяжелой цепи. В соответствии с определенными вариантами осуществления у константного участка тяжелой цепи отсутствует одна или несколько аминокислот на С-конце, и он имеет, например, С-концевую последовательность LSPG (SEQ ID NO: 276) или LSP.

Аминокислотные последовательности иллюстративных тяжелых и легких цепей изложены в табл. 11 и соответствуют SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 и 362 для тяжелых цепей и SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 и 371 для легких цепей.

Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80, 75 или 70% идентична любой из тяжелых или легких цепей, изложенных в табл. 11 (или их варибельным участкам), например SEQ ID NO: 13-19, 26-32, 40-45, 52-61, 71-77, 84-90, 97-105, 116-121, 128-137, 227-275, 337-341, 348-352, 361, 362 и 371, можно применять для образования антител к GITR человека, имеющих желаемые характеристики, например таких антител, описанных далее в настоящем документе. Иллюстративными вариантами являются содержащие аллотипическую вариацию, например, в константном домене, и/или мутацию в варибельных или константных участках, такую как мутации, раскрытые в настоящем документе. Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислотой (за счет замены, добавления или делеции) от любой из тяжелых или легких цепей, изложенных в табл. 11 (или их варибельных участков), можно применять для образования антител к GITR человека, имеющих желаемые характеристики, например таких антител, описанных далее в настоящем документе.

В соответствии с различными вариантами осуществления вышеописанные антитела проявляют одно или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, одиннадцать или все из следующих функциональных свойств:

(1) связывание с растворимым человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода Вiasоге;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении по Скэтчарду;

(3) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении с помощью метода FACS;

(4) связывание с GITR яванского макака, например связывание с мембраносвязанным GITR яванского макака, например с  $EC_{50}$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода FACS;

(5) индукцию или усиление активации Т-клеток, как, например, при наличии включения CD3 (например, при наличии субоптимальных концентраций антитела к CD3), что подтверждается (i) повышенной продукцией IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в экспрессирующих GITR Т-клетках и/или (ii) усиленной пролиферацией Т-клеток;

(6) индукцию или усиление активации Т-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур;

(7) ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на 3A9-hGITR клетках, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS;

(8) не более чем частичное ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на активированных Т-клетках;

(9) связывание с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4), например, с прерывающемся эпитопом в пределах аминокислотных последовательностей PTGG-PGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) связывание как с О-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR;

(11) наличие агонистической активности в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность; и

(12) конкуренцию в любом из направлений или в обоих направлениях за связывание с человеческим GITR с 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10.

Такие антитела включают в себя, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к GITR, описанные в настоящем документе, связываются как с гликозилированным (например, N-связанное или О-связанное гликозилированное), так и с негликозилированным человеческим GITR.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к GITR, описанные в настоящем документе, связываются с конформационным эпитопом.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к GITR, описанные в настоящем документе, связываются с аминокислотными остатками в пределах следующего участка в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4):

QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215),

соответствующего аминокислотным остаткам 1-39 в изоформах 1, 2 или 3 зрелого человеческого GITR (SEQ ID NO: 4).

В соответствии с одним вариантом осуществления описанное в настоящем документе антитело к GITR связывается с аминокислотными остатками в пределах следующего участка в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4):

QRPTGGPGCGPGRLLLTGT (SEQ ID NO: 216),

соответствующего аминокислотным остаткам 1-20 в изоформах 1, 2 или 3 зрелого человеческого GITR (SEQ ID NO: 4).

В соответствии с одним вариантом осуществления описанное в настоящем документе антитело к GITR связывается с аминокислотными остатками в пределах следующих участков в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4):

PTGGPGCGPGRLLLTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218).

Модифицированные константные домены тяжелой цепи.

Как дополнительно обсуждается в настоящем документе, константный участок тяжелой цепи в антителах к GITR, описанных в настоящем документе, может относиться к любому изотипу, например IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, или их комбинациям и/или их модификациям. Антитело к GITR может характеризоваться эффекторной функцией или может характеризоваться пониженной эффекторной функцией или ее отсутствием. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR содержат модифицированный константный участок тяжелой цепи, который предоставляет антителу улучшенные свойства. Как показано в разделе "Примеры", антитела к GITR, имеющие модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий шарнир IgG2, являются более сильными агонистами в сравнении с антителами, имеющими такой же вариабельный участок, но с шарниром, не являющимся шарниром IgG2. Например, антитело, содержащее шарнир IgG2, CH2 и CH3 домен изотипа IgG1 и либо обладающее эффекторной функцией, либо не обладающее ею, характеризуется усиленной агонистической активностью, измеряемой по усиленной секреции IFN- $\gamma$  и IL-2 из Т-клеток, инкубируемых с антителами. Не намереваясь ограничиваться конкретным механизмом действия, выдвигают гипотезу, что антитела к GITR, имеющие шарниры IgG2, образуют более крупные комплексы антитело-антиген и более эффективно интернализуются, тем самым обеспечивая в результате повышенную агонистическую активность. Полагают, что образование крупных комплексов является результатом более высокой жесткости шарнира IgG2 в сравнении с шарнирами других изотипов (например, IgG1, IgG3 и IgG4). Как дополнительно описано в разделе "Примеры", считается, что усиленная агонистическая активность связана с более высокой или более низкой аффинностью антитела. Соответственно в настоящем документе предполагаются антитела к GITR, имеющие модифицированный константный участок тяжелой цепи, причем антитела к GITR характеризуются усиленной агонистической активностью, и при этом антитело с модифицированным константным участком тяжелой цепи связывается с GITR с аффинностью, подобной аффинности тех же вариабельных участков, но с отличающимся константным участком тяжелой цепи.

Соответственно в настоящем документе также предполагаются способы усиления агонистической активности антител к GITR, предусматривающие обеспечение антитела к GITR, которое имеет шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и замену шарнира, не являющегося шарниром IgG2, на шарнир IgG2. Антитела, которые могут получать преимущество от такой модификации, включают в себя любое антитело к GITR, такое как антитела, известные в уровне техники, например антитело 6C8 или гуманизованное антитело, имеющее CDR из 6C8, которое описано, например, в международной заявке WO2006/105021; антитело, описанное в патентных документах WO2011/028683, JP2008278814, KR20080105674, US20040072566, US2001472565, US20140065152 или в WO2015/031667.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир из изотипа IgG2 ("шарнир IgG2") и CH1, CH2 и CH3 домен. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и CH1, CH2 и CH3 домен, причем по меньшей мере один CH1, CH2 и CH3 доменов не относится к изотипу IgG2. Шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2 дикого типа, например шарнир человеческого IgG2 дикого типа (например, ERKCCVECPCPPAPPVAG; SEQ ID NO: 291) или его вариант при условии, что шарнир IgG2 сохраняет способность к приданию антителу усиленной активности в сравнении с таким же антителом, которое содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления вариант шарнира IgG2 сохраняет жесткость или негибкость, подобные таковым у шарнира IgG2 дикого типа. Жесткость шарнира можно определить, например, с помощью компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как ядерный магнитный резонанс (NMR), рентгеноструктурной кристалло-

графии (В-факторы) или по скорости осаждения при аналитическом ультрацентрифугировании (AUC) для измерения или сравнения радиуса инерции у антител, содержащих шарнир. Шарнир может характеризоваться подобной или более высокой жесткостью в сравнении с другим шарниром, если содержащее шарнир антитело характеризуется значением, полученным в одном из анализов, описанных в предыдущем предложении, которое отличается от значения для такого же антитела с отличающимся шарниром, например шарниром IgG1, менее чем на 5, 10, 25, 50, 75 или 100%. Специалист в данной области техники будет способен определить из анализов, характеризуется ли шарнир жесткостью, по меньшей мере, подобной жесткости другого шарнира, интерпретируя результаты этих анализов. Иллюстративный вариант шарнира человеческого IgG2 представляет собой шарнир IgG2, который содержит замену одного или нескольких из четырех цистеиновых остатков (т.е. C219, C220, C226 и C229). Цистеин может быть заменен серином. Иллюстративный шарнир IgG2 представляет собой шарнир человеческого IgG2, содержащий мутацию C219S (например, ERKSCVCEPPCPAPPVAG; SEQ ID NO: 292). Другие варианты шарнира IgG2, которые можно применять, включают в себя шарниры человеческого IgG2, содержащие замену C220, C226 и/или C229, например мутацию C220S, C226S или C229S (которую можно комбинировать с мутацией C219S). Шарнир IgG2 также может представлять собой шарнир IgG2, в котором часть шарнира относится к другому изотипу (т.е. он представляет собой химерный шарнир) при условии, что жесткость химерного шарнира является, по меньшей мере, подобной жесткости шарнира IgG2 дикого типа. Например, шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2, в котором нижний шарнир (который определен в табл. 2) относится к изотипу IgG1 и представляет собой, например, нижний шарнир IgG1 дикого типа. Дополнительные мутации в шарнире IgG2, которые можно применять в шарнире IgG2, включают в себя мутации SE (S267E), SELF (S267E/L328F), SDIE (S239D/I332E), SEFF и GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E).

"Гибридный" или "химерный" шарнир считается относящимся к конкретному изотипу, если более половины последовательных аминокислот в шарнире происходят из этого изотипа. Например, шарнир, имеющий верхний и средний шарнир из IgG2 и нижний шарнир из IgG1 считают шарниром IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH1 домен, который представляет собой CH1 домен дикого типа из изотипа IgG1 или "IgG2" ("CH1 домен IgG1" или "CH1 домен IgG2" соответственно). Также можно применять CH1 домены из изотипов IgG3 и IgG4 ("CH1 домен IgG3" и "CH1 домен IgG2" соответственно). CH1 домен также может представлять собой вариант CH1 домена дикого типа, например вариант CH1 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH1 доменов включают в себя A114C и T173C.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH2 домен, который представляет собой CH2 домен дикого типа из изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 ("CH2 домен IgG1", "CH2 домен IgG2", "CH2 домен IgG3" или "CH2 домен IgG4" соответственно). CH2 домен также может представлять собой вариант CH2 домена дикого типа, например вариант CH2 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH2 доменов включают варианты, которые модулируют биологическую активность Fc-участка антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полувыведения антитела или его стабильность. В соответствии с одним вариантом осуществления CH2 домен представляет собой CH2 домен человеческого IgG1 с мутацией A330S и P331S, причем CH2 домен характеризуется пониженной эффекторной функцией в сравнении с таким же CH2 доменом без мутаций. Другие мутации дополнительно изложены в других местах в настоящем документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH3 домен, который представляет собой CH3 домен дикого типа из изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 ("CH3 домен IgG1", "CH3 домен IgG2", "CH3 домен IgG3" или "CH3 домен IgG4" соответственно). CH3 домен также может представлять собой вариант CH3 домена дикого типа, например вариант CH3 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH3 доменов включают варианты, которые модулируют биологическую активность Fc-участка антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полувыведения антитела или его стабильность.

В целом, варианты CH1, шарнира, CH2 или CH3 доменов могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций, и/или не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, или 1-10 или 1-5 мутаций, или могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности дикого типа соответствующего домена (CH1, шарнира, CH2, или CH3 домена соответственно) при условии, что константный участок тяжелой цепи, содержащий конкретный вариант, сохраняет необходимую биологическую активность.

В табл. 3 изложены иллюстративные константные участки тяжелой цепи человека, содержащие человеческие CH1, шарнир, CH2 и/или CH3 домены, причем каждый домен представляет собой либо домен дикого типа, либо его вариант, который предоставляет желаемую биологическую активность константного участка тяжелой цепи. Незаполненная ячейка в табл. 3 указывает на то, что домен присутствует или не присутствует, и если он присутствует, то может относиться к любому изотипу, например IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Например, антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, представленный в

табл. 3 под номером 1, представляет собой антитело, которое содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий, по меньшей мере, шарнир IgG2, и которое также может содержать СН1, СН2 и/или СН3 домен, и если он присутствует, данный СН1, СН2 и/или СН3 домен относится к изолипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В качестве другого пример для понимания табл. 3, антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи представленный под номером 8, представляет собой антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, содержащий СН1 домен IgG1, шарнир IgG2 и СН2 домен IgG1, и которое также может содержать или не содержать СН3 домен, который, если он присутствует, может относиться к изолипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Таблица 3  
Иллюстративные конфигурации константных участков тяжелой цепи человека

МНССР*	СН1	Шарнир	СН2	СН3
1		IgG2		
2	IgG1	IgG2		
3	IgG2	IgG2		
4		IgG2	IgG1	
5		IgG2	IgG2	
6		IgG2		IgG1
7		IgG2		IgG2
8	IgG1	IgG2	IgG1	
9	IgG1	IgG2	IgG2	
10	IgG2	IgG2	IgG1	
11	IgG2	IgG2	IgG2	
12	IgG1	IgG2		IgG1
13	IgG1	IgG2		IgG2
14	IgG2	IgG2		IgG1
15	IgG2	IgG2		IgG2
16		IgG2	IgG1	IgG1
17		IgG2	IgG1	IgG2
18		IgG2	IgG2	IgG1
19		IgG2	IgG2	IgG2
20	IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
21	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
22	IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
23	IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
24	IgG2	IgG2	IgG1	IgG1
25	IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
26	IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
27	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

\* Модифицированный константный участок тяжелой цепи.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит константный участок тяжелой цепи, показанный в табл. 3, и характеризуется усиленной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит такого конкретного константного участка тяжелой цепи. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, показанный в табл. 3, характеризуется усиленной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2 или такой же шарнир IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, показанный в табл. 3, характеризуется усиленной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2, а содержит, например, шарнир IgG1, IgG3 или IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, показанный в табл. 3, характеризуется усиленной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит один или несколько из таких же СН1, шарнира, СН2 или СН3 домена. Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, показанный в табл. 3, характеризуется усиленной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2 и СН1, СН2 и/или СН3 домен конкретного изолипа. Например, антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, показанный в табл. 3 под номером 22, может характеризоваться усиленной агонистической активностью в сравнении с (i) таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2 (например, шарнир

IgG1, IgG3 или IgG4); (ii) таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2 и CH1 IgG1, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и/или CH1, не являющийся CH1 IgG1; (iii) таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2 и CH2 IgG2, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и/или CH2, не являющийся CH2 IgG2; (iv) таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и/или CH3, не являющийся CH3 IgG1; (v) таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2, CH1 IgG1 и CH2 IgG2, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и/или CH1, не являющийся CH1 IgG1, и/или CH2, не являющийся CH2 IgG2; (vi) таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2, CH1 IgG1 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и/или CH1, не являющийся CH1 IgG1, и/или CH3, не являющийся CH3 IgG1; (vii) таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2, CH2 IgG2 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и/или CH, не являющийся CH IgG2, и/или CH3, не являющийся CH3 IgG1; (viii) или таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит шарнир IgG2, CH1 IgG1, CH2 IgG2 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир, не являющийся шарниром IgG2, и/или CH1, не являющийся CH1 IgG1, и/или CH2, не являющийся CH2 IgG2, и/или CH3, не являющийся CH3 IgG1.

Иллюстративные модифицированные константные участки тяжелой цепи, которые могут быть связаны с переменными участками антитела к GITR, например, описанными в настоящем документе, приведены в табл. 4, в которой изложена идентификационная информация для каждого из доменов.

Таблица 4

## Иллюстративные модифицированные константные участки тяжелой цепи

Модифицированный константный участок тяжелой цепи	CH1	Шарнир	CH2	CH3	SEQ ID NO целого МПССР
IgG1-IgG2-IgG1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:278	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:293	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:280	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:283
IgG1-IgG2-IgG1f2	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:278	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:291	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:280	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:287
IgG1-IgG2CS-IgG1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:278	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:294	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:280	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:284
IgG1-IgG2CS-IgG1f2	IgG1 дикого типа	IgG2 C219S SEQ ID NO:292	IgG1 дикого типа	IgG1 дикого типа	SEQ ID NO:288

	SEQ ID NO:278		SEQ ID NO:280	SEQ ID NO:282	
IgG2-IgG1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:279	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:293	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:280	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:223
IgG2-IgG1f2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:279	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:291	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:280	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:289
IgG2CS-IgG1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:279	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:294	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:280	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:225
IgG2CS-IgG1f2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:279	C219S IgG2 SEQ ID NO:292	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:280	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:290
IgG1-IgG2-IgG1.1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:278	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:291	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO: 285
IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:278	IgG2 C219S SEQ ID NO:292	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO: 286
IgG2-IgG1.1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:279	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:291	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:224
IgG2CS-IgG1.1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:279	IgG2 C219S SEQ ID NO:292	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:281	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:282	SEQ ID NO: 226

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2, содержащий SEQ ID NO: 291, 292, 293 или 294, или его вариант, такой как шарнир IgG2, содержащий аминокислотную последовательность, которая (i) отличается от SEQ ID NO: 291, 292, 293 или 294 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 291, 292, 293 или 294 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 291, 292, 293 или 294 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 291, 292, 293 или 294, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи предоставляет усиленную агонистическую активность антителу к GITR в сравнении с другим константным участком тяжелой цепи, например константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2, или в сравнении с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH1 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 278, или CH1 домен IgG2, содержащий SEQ ID NO: 279 или вариант SEQ ID NO: 278 или 279, причем данный вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 278 или 279 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 278 или 279 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 278 или 279 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 278 или 279, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом антитело к GITR, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется усиленной агонистической активностью в сравнении с такой активностью у антитела к GITR, но с другим константным участком тяжелой цепи, например константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2, или в сравнении с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит модифи-

цированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH2 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 280 или 281 или вариант SEQ ID NO: 280 или 281, причем данный вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 280 или 281 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 280 или 281 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 280 или 281 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 280 или 281, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи предоставляет усиленную агонистическую активность антителу к GITR в сравнении с другим константным участком тяжелой цепи, например константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2, или в сравнении с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH3 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 282 или вариант SEQ ID NO: 282, причем данный вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 282 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 282 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 282 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 282, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи предоставляет усиленную агонистическую активность в сравнении с другим константным участком тяжелой цепи, например константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2, или в сравнении с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2.

Модифицированные константные участки тяжелой цепи также могут содержать комбинацию CH1, шарнира, CH2 и CH3 доменов, описанных выше.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 или 290 или вариант SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 или 290, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 или 290 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 или 290 не более чем 10, 9, 8, 7, 6,5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 или 290 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 или 5-10 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 283, 284, 285 286, 287, 288, 289 или 290, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи предоставляет усиленную агонистическую активность в сравнении с другим константным участком тяжелой цепи, например константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2, или в сравнении с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не являющийся шарниром IgG2.

Модифицированные константные участки тяжелой цепи могут характеризоваться (i) подобной, пониженной или повышенной эффекторной функцией (например, связыванием с FcγR) в сравнении с константным участком тяжелой цепи дикого типа и или (ii) подобным, пониженным или повышенным периодом полувыведения (или связыванием с FcRn-рецептором) в сравнении с константным участком тяжелой цепи дикого типа.

III. Антитела, имеющие конкретные последовательности зародышевой линии.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит переменный участок тяжелой цепи из конкретного гена зародышевой линии тяжелой цепи иммуноглобулина и/или переменный участок легкой цепи из конкретного гена зародышевой линии легкой цепи иммуноглобулина.

Как продемонстрировано в настоящем документе, были получены человеческие антитела, специфичные в отношении GITR, которые содержат переменный участок тяжелой цепи, который является продуктом гена или происходит из гена VH 3-33, гена VH 3-10, гена VH 3-15, VH 3-16, гена VH JH6b, гена VH 6-19, гена VH 4-34 и/или гена VH JH3b человеческой зародышевой линии. Соответственно в настоящем документе предполагаются выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязываю-

щие части, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи, который является продуктом или происходит из гена VH человеческой зародышевой линии, выбранного из группы, состоящей из VH 3-33, VH 3-10, VH 3-15, VH 3-16, VH JH6b, VH 6-19, VH 4-34 и/или VH JH3b.

Были получены человеческие антитела, специфичные в отношении GITR, которые содержат вариабельный участок легкой цепи, который является продуктом гена или происходит из гена VK L6, гена VK L18, гена VK L15, гена VK L20, гена VK A27, гена VK JK5, гена VK JK4, гена VK JK2 и гена VK JK1 человеческой зародышевой линии. Соответственно в настоящем документе предполагаются выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельный участок легкой цепи, который является продуктом или происходит из гена VK человеческой зародышевой линии, выбранного из группы, состоящей из VK L6, VK L18, VK L15, VK L20, VK A27, VK JK5, VK JK4, VK JK2 и VK JK1.

Предпочтительными антителами, описанными в настоящем документе, являются антитела, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи, который является продуктом или происходит из одного из вышеперечисленных генов VH человеческой зародышевой линии, а также содержащие вариабельный участок легкой цепи, который является продуктом или происходит из одного из вышеперечисленных генов VK человеческой зародышевой линии, как показано на фиг. 2-11.

Как используется в настоящем документе, человеческое антитело содержит вариабельные участки тяжелой или легкой цепи, которые "являются продуктом" или "происходят из" конкретной последовательности зародышевой линии, если вариабельные участки антитела получены из системы, в которой используются гены зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены человеческих иммуноглобулинов, антигеном, представляющим интерес, или скрининг библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемых на фаге, с использованием антигена, представляющего интерес. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "происходит из" последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, можно идентифицировать как таковое путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотными последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов и выбора последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, которая является наиболее близкой в плане последовательности (т.е. характеризуется наибольшей % идентичностью) к последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "происходит из" последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, может содержать отличающиеся аминокислоты по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, вследствие встречающихся в естественных условиях соматических мутаций или намеренного введения сайт-направленной мутации. Тем не менее, последовательность аминокислот выбранного человеческого антитела, как правило, по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело как человеческое антитело при сравнении с аминокислотными последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов из других видов (например, мышинными последовательностями зародышевой линии). В определенных случаях аминокислотная последовательность человеческого антитела может быть по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентичной аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина. Как правило, человеческое антитело, происходящее из конкретной последовательности человеческой зародышевой линии, будет проявлять не более чем 10 аминокислот, отличающихся от аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина. В определенных случаях человеческое антитело может проявлять не более чем 5 или даже не более чем 4, 3, 2 или 1 аминокислоту, отличающуюся от аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина.

#### IV. Гомологичные антитела.

В настоящем документе охватываются антитела, имеющие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые являются гомологичными аминокислотным последовательностям предпочтительных антител, описанных в настоящем документе, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител к GITR, описанных в настоящем документе.

Например, выделенное антитело к GITR или его антигенсвязывающая часть могут содержать вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем:

(а) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 и 335, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 и 335;

(b) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, вы-

бранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 и 336, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 и 336;

(c) антитело специфично связывается с GITR и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или все из следующих функциональных свойств:

(1) связывание с растворимым человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода *Biacore*;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении по Скэтчарду;

(3) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении с помощью FACS;

(4) связывание с GITR яванского макака, например связывание с мембраносвязанным GITR яванского макака, например с  $EC_{50}$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода FACS;

(5) индукцию или усиление активации Т-клеток, как, например, при наличии включения CD3 (например, при наличии субоптимальных концентраций антитела к CD3), что подтверждается (i) повышенной продукцией IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в экспрессирующих GITR Т-клетках и/или (ii) усиленной пролиферацией Т-клеток;

(6) индукцию или усиление активации Т-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур;

(7) ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на 3A9-hGITR клетках, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS;

(8) не более чем частичное ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на активированных Т-клетках;

(9) связывание с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4), например, с прерывающимся эпитопом в пределах аминокислотных последовательностей PTGG-PGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) связывание как с O-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR;

(11) наличие агонистической активности в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность;

(12) конкуренцию в любом из направлений или в обоих направлениях за связывание с человеческим GITR с 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и 6G10.

В соответствии с различными вариантами осуществления антитело может проявлять одно или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять, десять, одиннадцать или все из функциональных свойств, перечисленных в пп.(1)-(12) выше. Антитело может представлять собой, например, человеческое антитело, гуманизованное антитело или химерное антитело.

Выделенное антитело к GITR или его антигенсвязывающая часть могут содержать тяжелую цепь и легкую цепь, причем:

(a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 и 362, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 и 362, при условии, что в соответствии с определенными вариантами осуществления, если последовательность является последовательностью тяжелой цепи с отсутствующей эффекторной функцией, мутации, придающие тяжелой цепи отсутствие эффекторной функции, не модифицируют (т.е. не производят модификаций в A234, E235, A237, S330 и S331);

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 и 371, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 57, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137, 338, 341 и 371;

(c) антитело специфично связывается с GITR и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или все из следующих функциональных свойств:

(1) связывание с растворимым человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 10 нМ или менее

(например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода Вiasoge;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении по Скэтчарду;

(3) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении с помощью FACS;

(4) связывание с GITR яванского макака, например связывание с мембраносвязанным GITR яванского макака, например с  $EC_{50}$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода FACS;

(5) индукцию или усиление активации Т-клеток, как, например, при наличии включения CD3 (например, при наличии субоптимальных концентраций антитела к CD3), что подтверждается (i) повышенной продукцией IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в экспрессирующих GITR Т-клетках и/или (ii) усиленной пролиферацией Т-клеток;

(6) индукцию или усиление активации Т-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур;

(7) ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на 3A9-hGITR клетках, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS;

(8) не более чем частичное ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на активированных Т-клетках;

(9) связывание с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4), например с прерывающимся эпитопом в пределах аминокислотных последовательностей PTGG-PGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) связывание как с O-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR;

(11) наличие агонистической активности в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность; и

(12) конкуренцию в любом из направлений или в обоих направлениях за связывание с человеческим GITR с 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и 6G10.

Также предполагаются антитела к GITR, содержащие CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL, которые отличаются от соответствующих CDR в 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10 изменениями 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 аминокислот (т.е. аминокислотными заменами, добавлениями или делециями). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит 1-5 изменений аминокислот в каждом из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 из CDR в сравнении с соответствующей последовательностью в 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит в сумме 1-5 изменений аминокислот во всех CDR в сравнении с CDR в 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит CDR V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, состоящие из CDR в 28F3, причем одна или несколько из аминокислот в одном или нескольких CDR представляют собой аминокислоты из одного из других антител к GITR, раскрытых в настоящем документе.

Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит CDR1 V<sub>H</sub>, содержащий модификации одной или нескольких аминокислот в сравнении с SYGMH (SEQ ID NO: 20), и может содержать, например, одну из следующих вырожденных последовательностей:

SYGXH (SEQ ID NO: 372), в которой X представляет собой любую аминокислоту, например M или F;

X<sub>1</sub>YGX<sub>2</sub>H, в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например S, N или D; и X<sub>2</sub> представляет собой любую аминокислоту, например M или F; и

X<sub>1</sub>YGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>, в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например S, N или D; X<sub>2</sub> представляет собой любую аминокислоту, например M или F, и X<sub>3</sub> представляет собой любую аминокислоту, например H или Q.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит CDR2 VH, содержащий модификации одной или нескольких аминокислот в сравнении с VIWYEGSNKYADSVKG (SEQ ID NO: 21), и может содержать одну из следующих вырожденных последовательностей:

VIWYX<sub>1</sub>GSNKX<sub>2</sub>YADSVKG (SEQ ID NO: 373), в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например E или A; и X<sub>2</sub> представляет собой любую аминокислоту, например Y или F; и

VIWYX<sub>1</sub>GSNKX<sub>2</sub>YX<sub>3</sub>DSVKG (SEQ ID NO: 374), в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например E, A, G или D; X<sub>2</sub> представляет собой любую аминокислоту, например Y или F; и X<sub>3</sub> представляет собой любую аминокислоту, например A или V.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит CDR3 VH, содержащий модификации одной или нескольких аминокислот в сравнении с GGSMVRGDYY-YGMDV (SEQ ID NO: 22), и может содержать, например, одну из следующих вырожденных последова-

тельностью:

GGSX<sub>1</sub>VRGDYYYGMDV (SEQ ID NO: 375), в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например M или V, L, I или A.

GGSX<sub>1</sub>VRGX<sub>2</sub>YYGMDV (SEQ ID NO: 376), в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например M или V, L, I или A; и X<sub>2</sub> представляет собой любую аминокислоту, например D или E. Конкретные комбинации X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> изложены в разделе "Примеры".

GG (6-7aa) MDVWYYX<sub>1</sub>MDVW (SEQ ID NO: 377), в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например G, S или V. В соответствии с определенными вариантами осуществления 6-7 аминокислот соответствуют аминокислотам в таком положении в последовательности CDR3 VH антитела к GITR, раскрытого в настоящем документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит CDR1 V<sub>L</sub>, содержащий модификации одной или нескольких аминокислот в сравнении с RASQGISSALA (SEQ ID NO: 23), и может содержать, например, одну из следующих вырожденных последовательностей:

RASQGISSXLA (SEQ ID NO: 378), в которой X представляет собой любую аминокислоту, например A или W (или A, W или Y); и

RASQG (2-3 aa) SX<sub>1</sub>LA (SEQ ID NO: 379), в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например W, Y или A, и 2-3 аминокислоты представляют собой любые аминокислоты, например GI, SVS или SVT.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит CDR2 V<sub>L</sub>, содержащий модификации одной или нескольких аминокислот в сравнении с DASSLES (SEQ ID NO: 24), и может содержать, например, одну из следующих вырожденных последовательностей:

DASSLXS (SEQ ID NO: 380), в которой X представляет собой любую аминокислоту, например E или Q; и

X<sub>1</sub>ASSX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>, в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например A, D или G; X<sub>2</sub> представляет собой любую аминокислоту, например L или R; X<sub>3</sub> представляет собой любую аминокислоту, например Q, E или A; и X<sub>4</sub> представляет собой любую аминокислоту, например S или T.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит CDR3 V<sub>L</sub>, содержащий модификации одной или нескольких аминокислот в сравнении с QQFNSYPYT (SEQ ID NO: 25), и может содержать, например, одну из следующих вырожденных последовательностей:

QQXNSYPYT (SEQ ID NO: 381), в которой X представляет собой любую аминокислоту, например F или Y; и

QQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SX<sub>3</sub>PX<sub>4</sub>T (SEQ ID NO: 382), в которой X<sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, например F или Y; X<sub>2</sub> представляет собой любую аминокислоту, например N или G; X<sub>3</sub> представляет собой любую аминокислоту, например Y или S; и X<sub>4</sub> представляет собой любую аминокислоту, например Y, W, I, P или Q.

Антитела, имеющие последовательности, гомологичные последовательностям 28F3, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8, 19D3, 18E10 и/или 6G10, например V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> участки с SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 и 335 и SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 и 336 соответственно, или тяжелые и легкие цепи с SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135 и 337 и SEQ ID NO: 16, 19, 29, 32, 42, 45, 56, 60, 61, 74, 87, 90, 101, 104, 105, 118, 121, 132, 133, 136, 137 и 338 соответственно, или CDR, можно получить посредством мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируются SEQ ID NO: 147, 154, 158, 162, 168, 172, 176, 182, 186, 353, и/или SEQ ID NO: 148, 155, 159, 163, 164, 169, 173, 177, 178, 183, 187, 188, 354, или SEQ ID NO: 149, 151, 152, 156, 160, 165, 170, 174, 179, 184, 189, 355, и/или SEQ ID NO: 150, 153, 157, 161, 166, 171, 175, 180, 185, 190, 191, 356, с последующим исследованием кодируемых измененных антител в отношении сохраненной функции (т.е. функций, изложенных в пунктах с (1) по (12) выше) с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

V. Антитела с консервативными модификациями.

Антитела к GITR могут содержать варибельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и варибельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем одна или несколько из этих последовательностей CDR содержат определенные аминокислотные последовательности на основе предпочтительных антител, описанных в настоящем документе (например, 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 и 6G10), или их консервативных модификаций, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител к GITR, описанных в настоящем документе. Соответственно выделенное антитело к GITR или его антигенсвязывающая часть могут содержать варибельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и варибельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем:

(а) последовательность CDR3 варибельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 и 344, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-

2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен;

(b) последовательность CDR3 варибельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 и 347, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен;

(c) антитело специфично связывается с GITR и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или все из следующих функциональных свойств:

(1) связывание с растворимым человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода Вiasоге;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении по Скэтчарду;

(3) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении с помощью FACS;

(4) связывание с GITR яванского макака, например связывание с мембраносвязанным GITR яванского макака, например с  $EC_{50}$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода FACS;

(5) индукцию или усиление активации Т-клеток, как, например, при наличии включения CD3 (например, при наличии субоптимальных концентраций антитела к CD3), что подтверждается (i) повышенной продукцией IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в экспрессирующих GITR Т-клетках и/или (ii) усиленной пролиферацией Т-клеток;

(6) индукцию или усиление активации Т-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур;

(7) ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на 3A9-hGITR клетках, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS;

(8) не более чем частичное ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на активированных Т-клетках;

(9) связывание с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4), например, с прерывающимся эпитопом в пределах аминокислотных последовательностей PTGG-PGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) связывание как с O-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR;

(11) наличие агонистической активности в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность; и

(12) конкуренцию в любом из направлений или в обоих направлениях за связывание с человеческим GITR с 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления последовательность CDR2 варибельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 и 343, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR2 варибельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 и 346, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления последовательность CDR1 варибельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 и 342, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR1 варибельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 и 345, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен.

В соответствии с различными вариантами осуществления антитело может проявлять одно или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или все из функциональных свойств, перечисленных в пунктах с (1) по (12) выше. Такие антитела могут представлять собой, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

Консервативные аминокислотные замены также можно производить в частях антител, отличных от CDR, или в дополнение к заменам в CDR. Например, консервативные модификации аминокислот могут быть произведены в каркасном участке или в Fc-участке. Варибельный участок или тяжелая или легкая цепь могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 консервативных аминокислотных замен в сравнении с последовательностями антител к GITR, представленных в настоящем документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR содержит ком-

бинацию консервативных и неконсервативных модификаций аминокислот.

VI. Антитела, которые связываются с тем же эпитопом на GITR, что и антитела, описанные в настоящем документе, или конкурируют с ними за связывание с GITR.

Также предполагаются антитела, которые конкурируют за связывание с GITR с конкретными антителами к GITR, описанными в настоящем документе (например, антитела 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 и 6G10). Такие конкурирующие антитела можно идентифицировать на основании их способности к конкурентному ингибированию связывания с GITR одного или нескольких из моноклональных антител 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10 в стандартных анализах связывания GITR. Например, можно применять стандартные анализы ELISA или конкурентные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок человеческого GITR иммобилизуют на планшете, добавляют различные концентрации не содержащего метки первого антитела, планшет промывают, добавляют меченое второе антитело и измеряют количество метки. Если повышенная концентрация не содержащего метки (первого) антитела (также называемого "блокирующим антителом") ингибирует связывание меченого (второго) антитела, считается, что первое антитело ингибирует связывание второго антитела с мишенью на планшете, или считается, что оно конкурирует со связыванием второго антитела. В качестве дополнения или альтернативы, анализ методом ВІАscore можно применять для оценки способности антител к конкуренции. Способность исследуемого антитела к ингибированию связывания антитела к GITR, описанного в настоящем документе, с GITR демонстрирует, что исследуемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с GITR.

Соответственно в настоящем документе предполагаются антитела к GITR, которые ингибируют связывание антител к GITR, описанных в настоящем документе, с GITR на клетках, например на активированных Т-клетках, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, и/или чье связывание с GITR на клетках, например на активированных Т-клетках, ингибируется по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, например, при измерении с помощью метода ELISA или FACS, как, например, при использовании анализа, описанного в следующем абзаце.

Иллюстративный конкурентный эксперимент, чтобы определить, например, блокирует ли первое антитело связывание второго антитела (т.е. "конкурирует с ним"), можно провести следующим образом: активированные человеческие Т-клетки получают следующим образом: мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяют из цельной крови человека с использованием градиента плотности фиколла и активируют 10 мкг/мл фитогемагглютинаина (PHA-L) (USBiol; № P3370-30) и 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 (Peprotech; № 200-02) в течение 3 суток. Активированные Т-клетки ресуспендируют в FACS буфере (PBS с 5% фетальной бычьей сыворотки) и высевают в количестве  $10^5$  клеток на лунку для образца в 96-луночный планшет. Планшет ставят на лед с последующим добавлением неконъюгированного первого антитела в концентрациях в диапазоне от 0 до 50 мкг/мл (трехступенчатое титрование, начиная от самой высокой концентрации 50 мкг/мл). Неродственный IgG можно использовать в качестве изотипического контроля для первого антитела, и его добавляют в тех же концентрациях (трехступенчатое титрование, начиная от наивысшей концентрации 50 мкг/мл). Образец, предварительно инкубируемый с 50 мкг/мл не содержащего метку второго антитела, можно включить в качестве положительного контроля для полного блокирования (100% ингибирования), а образец без антитела при первичном инкубировании можно использовать в качестве отрицательного контроля (нет конкуренции; 0% ингибирования). После 30 мин инкубирования меченое, например биотинилированное, второе антитело добавляют в концентрации 2 мкг/мл на лунку без промывания. Образцы инкубируют в течение еще 30 мин на льду. Несвязавшиеся антитела удаляют путем промывания клеток FACS буфером. Связанное с клетками меченое вторичное антитело выявляют с использованием средства, которое выявляет метку, например, конъюгированного с PE стрептавидина (Invitrogen, № S21388 в каталоге) для выявления биотина. Образцы исследуют на проточном цитометре FACS Calibur (BD, Сан-Хосе) и анализируют с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc, Ашленд, Орегон). Результаты можно представить в виде % ингибирования (т.е. вычитая из 100% количество метки при каждой концентрации, поделенное на количество метки, полученное при отсутствии блокирующего антитела). Как правило, аналогичный эксперимент затем проводят со сменой ролей, т.е. первым антителом становится второе антитело, а вторым антителом становится первое антитело. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, по меньшей мере, частично (например, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%) или полностью (100%) блокирует связывание другого антитела с мишенью, например с человеческим GITR или его частью, независимо от того, происходит ли ингибирование, когда первым антителом является одно или другое антитело. Первое и второе антитело "перекрестно блокируют" связывание друг друга с мишенью, когда антитела конкурируют друг с другом в обе стороны, т.е. в конкурентных экспериментах, в которых первым добавляют первое антитело, и в конкурентных экспериментах, в которых первым добавляют второе антитело. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR связываются с тем же эпитопом, что и антитела к GITR, описанные в настоящем документе (например, антитела 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10), например, при определении с помощью заданной методики картирования эпитопов. Как дополни-

тельно обсуждается в настоящем документе, антитело 28F3 связывается в пределах участка в человеческом GITR в пределах QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215). Соответственно в соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR связывается с аминокислотными остатками в пределах участка QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215), соответствующего аминокислотным остаткам 1-39 в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4). В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к GITR связывается с аминокислотными остатками в пределах участка QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGT (SEQ ID NO: 216) в зрелом человеческом GITR. В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к GITR, описанные в настоящем документе, связываются с аминокислотными остатками в пределах участка PTGGPGCGPGRLLLTGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) в зрелом человеческом GITR. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR связываются с аминокислотными последовательностями PTGGPGCGPGRLLLTGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) при определении с помощью метода HDX, например, с использованием протокола, изложенного в разделе "Примеры".

Методики определения того, что антитела связываются с "тем же эпитопом на GITR", что и антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурные анализы кристаллов комплексов антиген-антитело, обеспечивающие разрешение эпитопов в атомном масштабе. В других методах отслеживается связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, причем потерю связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считают показателем компонента эпитопа. Кроме того, для картирования эпитопов также можно применять вычислительные комбинаторные методы. Методы также могут основываться на способности антитела, представляющего интерес, выделять на основе аффинности специфичные короткие пептиды из комбинаторных пептидных библиотек с использованием фагового дисплея. Пептиды затем рассматривают как ключи к определению эпитопов, соответствующих антителу, используемому для скрининга пептидной библиотеки. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, с помощью которых, как было показано, картируют конформационные прерывающиеся эпитопы.

Антитела, которые конкурируют за связывание с антителами к GITR, описанными в настоящем документе, или связываются с тем же эпитопом, что и они, можно идентифицировать с использованием методов, известных в уровне техники. Например, можно иммунизировать мышей человеческим GITR, как описано в настоящем документе, получить гибридомы, а полученные в результате моноклональные антитела подвергнуть скринингу в отношении способности конкурировать с антителом, описанным в настоящем документе, за связывание с GITR. Мышей также можно иммунизировать меньшим фрагментом GITR, содержащим эпитоп, с которым связывается антитело. Эпитоп или участок, содержащий эпитоп, можно локализовать, например, посредством скрининга в отношении связывания с рядом перекрывающихся пептидов, охватывающих GITR. В качестве альтернативы можно применять метод по Jespers et al., *Biotechnology* 12:899, 1994; для управления селекцией антител, имеющих такой же эпитоп, что и описанное в настоящем документе антитело к GITR, и, следовательно, подобные ему свойства. При использовании фагового дисплея вначале тяжелую цепь антитела к GITR спаривают с репертуаром легких цепей (предпочтительно человеческих) для селекции связывающегося с GITR антитела, а затем новую легкую цепь спаривают с репертуаром тяжелых цепей (предпочтительно человеческих) для селекции связывающегося с GITR антитела (предпочтительно человеческого), имеющего такой же эпитоп или участок с эпитопом, что и антитело к GITR, описанное в настоящем документе. В качестве альтернативы варианты антитела, описанного в настоящем документе, можно получить посредством мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи антитела.

Сканирующий аланином мутагенез, который описан в Cunningham and Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085; или некоторые другие формы точечного мутагенеза аминокислотных остатков в GITR также можно использовать для определения функционального эпитопа для антитела к GITR. Тем не менее, исследования с использованием мутагенеза также могут выявить аминокислотные остатки, которые являются ключевыми для общей трехмерной структуры GITR, но которые не задействованы непосредственно в контактах антитело-антиген, и, следовательно, могут быть необходимы другие методы для подтверждения функционального эпитопа, определенного при помощи этого метода.

Эпитоп или участок с эпитопом ("участок с эпитопом" представляет собой участок, содержащий эпитоп или перекрывающийся с эпитопом), связываемый специфичным антителом, также можно определить, оценивая связывание антитела с пептидами, содержащими фрагменты GITR, например неденатурированные или денатурированные фрагменты. Ряд перекрывающихся пептидов, охватывающий последовательность GITR (например, человеческого GITR) можно синтезировать и подвергнуть скринингу в отношении связывания, например, в прямом анализе методом ELISA, конкурентом анализе методом ELISA (при котором пептиды оценивают в отношении их способности к предотвращению связывания антитела с GITR, связанным с лункой микротитровального планшета) или на чипе. Такие методы скрининга пептидов могут быть неспособны к выявлению некоторых прерывающихся функциональных эпитопов, т.е. функциональных эпитопов, которые включают аминокислотные остатки, которые не являются

смежными по линии первичной последовательности полипептидной цепи G1TR.

Эпитоп также можно идентифицировать с помощью метода определения структуры белков на основе MS, такого как масс-спектрометрия с использованием водородно/дейтериевого обмена (HDX-MS) и быстрого фотохимического окисления белков (FPOP). HDX-MS можно осуществлять, например, как описано далее в разделе "Примеры" и в Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95; причем методы из данного источника специально включены в данный документ посредством ссылки. FPOP можно осуществлять, как описано, например, в Hambley and Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, причем методы из данного источника специально включены в данный документ посредством ссылки.

Эпитоп, связываемый антителами к G1TR, также можно определить с помощью структурных методов, таких как рентгенографическое определение структуры кристалла (например, WO2005/044853), молекулярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (NMR), в том числе определение с помощью NMR скоростей обмена H-D лабильных водородов в амидных группах в G1TR, когда он является несвязанным, и когда он связан в комплекс с антителом, представляющим интерес (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31, 11335-11347; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32, 6884-6891).

Что касается рентгеноструктурной кристаллографии, кристаллизацию можно проводить с использованием любого из методов, известных в уровне техники (например, Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr. D* 50:339-350; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23), в том числе метод "microbatch" (например, Chayen (1997) *Structure* 5:1269-1274), метод диффузии паров из "висящей капли" (например, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303), затравливания и диализа. Желательно применение препарата белка с концентрацией, составляющей по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Кристаллизация может лучше всего осуществляться в растворе осадителя, содержащем полиэтиленгликоль 1000-20000 (PEG; со средним молекулярным весом в диапазоне от приблизительно 1000 до приблизительно 20000 Да, предпочтительно от приблизительно 5000 до приблизительно 7000 Да, более предпочтительно приблизительно 6000 Да) в концентрациях в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 30% (вес./об.). Также желательно, чтобы он включал стабилизирующее белок средство, например глицерин в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 20%. Подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, также может быть желательна в растворе осадителя, предпочтительно в концентрации в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мМ. Осадитель предпочтительно стабилизирован буфером при pH от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Конкретные буферы, пригодные в растворе осадителя, могут изменяться и являются широко известными в уровне техники (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Примеры пригодных буферов включают в себя HEPES, Tris, MES и ацетатный буфер, но не ограничиваются ими. Кристаллы можно выращивать при широком диапазоне температур, в том числе 2, 4, 8 и 26°C.

Кристаллы антитело-антиген можно изучать с использованием широко известных рентгенодифракционных методов и можно уточнить с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, реализуется Molecular Simulations, Inc.; см., например, Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H.W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; публикацию заявки на патент США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst. D* 49:37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) *Acta Cryst. D* 56:1313-1323), раскрытия которых тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Антитела к G1TR могут связываться с тем же эпитопом, что и любое из антител к G1TR, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в настоящем документе, что определяется с помощью методики картирования эпитопов, такой как методика, описанная в настоящем документе.

#### VII. Сконструированные и модифицированные антитела.

$V_H$  и  $V_L$  участки.

Также предполагаются сконструированные и модифицированные антитела, которые можно получить с использованием антитела, имеющего одну или несколько из последовательностей  $V_H$  и/или  $V_L$ , раскрытых в настоящем документе, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированный антитело может иметь модифицированные свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно конструировать, модифицируя один или несколько остатков в пределах одного или обоих переменных участках (т.е.  $V_H$  и/или  $V_L$ ), например в пределах одного или нескольких CDR участков и/или в пределах одного или нескольких каркасных участков. В качестве дополнения или альтернативы, антитело можно конструировать, модифицируя остатки в пределах константного участка(участков), например, для изменения эффекторной функции(функций) антитела.

Одним типом конструирования переменного участка, который можно осуществлять, является CDR-прививка. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести гипервариабельных участках (CDR) тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR являются более различными у отдельных антител, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR являются ответственными за большинство взаимодействий антитело-антиген, представляется воз-

возможным обеспечение экспрессии рекомбинантных антител, которые имитируют свойства конкретных встречающихся в естественных условиях антител, путем конструирования векторов экспрессии, которые включают в себя последовательности CDR из конкретного встречающегося в естественных условиях антитела, привитые на каркасные последовательности из отличающегося антитела с отличающимися 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. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; патент США № 5225539 за авторством Winter и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen и соавт.).

Соответственно другой вариант осуществления, описанный в настоящем документе, относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 и 342, SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 и 343 и SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 и 344 соответственно, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 и 345, SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 и 346 и SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 и 347 соответственно. Таким образом, такие антитела содержат последовательности CDR V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> моноклональных антител 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10, причем они могут содержать отличающиеся каркасные последовательности из этих антител.

Такие каркасные последовательности можно получить из баз данных ДНК общего пользования или опубликованных источников, которые включают последовательности генов зародышевой линии антител. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов вариабельных участков тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных человеческих последовательностей зародышевой линии "VBase" (доступна в сети Интернет по адресу [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), а также в Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox, J.P.L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; причем содержание каждого из данных источников специально включено в данный документ посредством ссылки.

Предпочтительными каркасными последовательностями для применения в антителах, описанных в настоящем документе, являются такие последовательности, которые подобны в плане структуры каркасным последовательностям, применяемым в антителах, описанных в настоящем документе. Последовательности CDR1, 2 и 3 V<sub>H</sub> и последовательности CDR1, 2 и 3 V<sub>L</sub> можно привить на каркасные участки, которые имеют последовательность, идентичную обнаруживаемой в гене зародышевой линии иммуноглобулина, из которого происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR можно привить на каркасные участки, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было выявлено, что в определенных случаях выгодно подвергнуть мутации остатки в пределах каркасных участков для сохранения или усиления способности к связыванию антигена у антитела (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen и соавт.).

Сконструированные антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя те антитела, в которых были произведены модификации каркасных остатков в пределах V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub>, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркаса производят для снижения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в "мутировании к первоначальному виду" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать посредством сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасных участков в их конфигурацию зародышевой линии, соматические мутации можно "мутировать к первоначальному виду" в последовательности зародышевой линии, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Также предполагается охват таких антител, подвергшихся "мутированию к первоначальному виду".

Другой тип модификации каркаса включает мутирование одного или нескольких остатков в пределах каркасного участка или даже в пределах одного или нескольких CDR участков с удалением T-клеточных эпитопов, чтобы таким образом снизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называется "деиммунизацией" и более подробно описан в публикации заявки на патент США № 20030153043 за авторством Саг и соавт.

Другим типом модификации вариабельного участка является мутирование аминокислотных остатков

ков в пределах CDR1, CDR2 и/или CDR3 участков  $V_H$  и/или  $V_L$ , чтобы тем самым улучшить одно или несколько свойств связывания (например, аффинности) у антитела, представляющего интерес. Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез можно осуществлять для введения мутации(мутаций), и эффект в отношении связывания антитела или другого функционального свойства, представляющего интерес, можно оценить в *in vitro* или *in vivo* анализах, которые описаны в настоящем документе и приведены в разделе "Примеры". Предпочтительно вводят консервативные модификации (которые обсуждаются выше). Мутации могут быть аминокислотными заменами, добавлениями или делециями, но предпочтительно они являются заменами. Более того, изменениям подвергаются, как правило, не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в пределах CDR участка.

Соответственно также предполагаются выделенные моноклональное антитела к GITR или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий: (a) CDR1 участок  $V_H$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 и 342, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 и 342; (b) CDR2 участок  $V_H$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 и 343, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 и 343; (c) CDR3 участок  $V_H$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 и 344, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 и 344; (d) CDR1 участок  $V_L$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 и 345, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 и 345; (e) CDR2 участок  $V_L$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 и 346, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 и 346; и (f) CDR3 участок  $V_L$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 и 347, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 и 347.

Метиониновые остатки в CDR антител могут окисляться, приводя в результате к потенциальной химической деградации и последующему снижению активности антитела. Соответственно также предполагаются антитела к GITR, у которых один или несколько метиониновых остатков в CDR тяжелой и/или легкой цепей заменены на аминокислотные остатки, которые не подвергаются окислительной деградации. В соответствии с одним вариантом осуществления метиониновые остатки в CDR антител 28F3, 18E10, 19D3 и 6G10 заменены на аминокислотные остатки, которые не подвергаются окислительной деградации.

Аналогично, из антител к GITR, в особенности, из CDR, могут быть удалены сайты дезамидирования.

Fc и модифицированные Fc.

Вариабельные участки антител к GITR, описанные в настоящем документе, могут быть связаны (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, который может относиться к любому аллотипу или изоаллотипу, например, для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v); и для K: Km, Km1, Km2, Km3 (см., например, Jefferies et al. (2009) mAbs 1:1).

В соответствии с определенными вариантами осуществления вариабельные участки антитела к GITR, описанные в настоящем документе, связаны с Fc, который связывается с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами (FcγI, FcγIIa или FcγIIIa) и тем самым стимулирует ADCC, а также может вызывать сокращение количества Т-клеток. В соответствии с определенными вариантами осуществления вариабельные участки антитела к GITR, описанные в настоящем документе, связаны с Fc, который вызывает сокращение количества. Как дополнительно описано в разделе "Примеры" (примеры 16 и 17), изотипы мышинового IgG2a и крысиного IgG2b (эквивалентен мышинному IgG2a при связывании с мышинными активирующими FcR) индуцировали наибольшее ингибирование роста опухоли в нескольких мышинных моделях опухолей. Изотипы mG2a, mG2b и rG2b антител к GITR оказывали небольшое влияние или индуцировали небольшие увеличения популяций  $T_{reg}$  на периферии в сравнении со значительным сокращением количества  $T_{reg}$  в опухолевом окружении, которое коррелировало с ингибированием роста опухоли. Напротив, изотип mIgG2a вызывал повышение процента CD8<sup>+</sup> клеток в сайте опухоли, тогда

как mIgG1 и крысиное IgG2b не вызывали или вызывали только незначительное повышение процента CD8+ клеток. Соответственно в соответствии с определенными вариантами осуществления вариabельные участки антител к GITR, описанные в настоящем документе, связаны с Fc человеческого IgG1 или IgG3, т.е. антитела относятся к изотипу IgG1 или IgG3. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR являются обедняющими антителами, в частности они сокращают количество  $T_{reg}$  клеток, которые находятся в опухолевом микроокружении (и тем самым усиливают противоопухолевую активность), но не сокращают значительно количество  $T_{eff}$  клеток, которые находятся в опухолевом микроокружении и опосредуют противоопухолевый эффект, и/или не сокращают значительно количество  $T_{reg}$  и  $T_{eff}$  клеток, которые находятся за пределами опухоли, например на периферии. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR относятся к изотипу (либо к встречающемуся в естественных условиях изотипу, либо к не встречающемуся в естественных условиях изотипу (например, к включающему мутацию(мутации)), который стимулирует сокращение количества  $T_{reg}$  клеток в сайте опухоли или их удаление из сайта опухоли и одновременную активацию  $T_{eff}$  клеток. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR создают повышенное соотношение  $T_{eff}$  и  $T_{reg}$  в сайте опухоли, что указывает на сильную противоопухолевую активность, и предпочтительно не обеспечивают значительного сокращения количества  $T_{reg}$  и  $T_{eff}$  клеток, которые находятся за пределами опухоли, например на периферии. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR блокируют иммунодепрессивную активность  $T_{reg}$ . В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR имеют Fc рецептор, не связывающийся с FcR, или с пониженным связыванием с FcR, например с пониженным связыванием с активирующими FcR. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR имеют Fc, который связывается с FcRIII или характеризуется усиленным связыванием с ним, что может обеспечивать усиленный агонизм.

В соответствии с определенными вариантами осуществления активность антитела к GITR усиления эндогенной иммунной реакции усиливают, оптимизируют или максимально увеличивают с помощью способа, предусматривающего селекцию, конструирование или модификацию Fc-участка антитела с тем, чтобы усилить связывание указанного Fc-участка с активирующим Fc-рецептором. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к GITR представляет собой TRX-518.

В соответствии с определенными вариантами осуществления вариabельные участки антител к GITR, описанные в настоящем документе, связаны с Fc с отсутствующей эффекторной функцией или Fc с практически отсутствующей эффекторной функцией, например IgG2 или IgG4.

Вариabельные участки антител к GITR, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с не встречающимся в естественных условиях Fc-участком, например с Fc с отсутствующей эффекторной функцией или с Fc с усиленным связыванием с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами (FcγI, FcγIIa или FcγIIIa), как, например, для усиления сокращения количества  $T_{reg}$  в опухолевом окружении.

Обычно вариabельные участки, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с Fc, содержащим одну или несколько модификаций, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полувыведения из сыворотки крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Более того, антитело, описанное в настоящем документе, можно химически модифицировать (например, один или несколько химических фрагментов могут быть прикреплены к антителу) или можно модифицировать с изменением его гликозилирования для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-участке соответствует нумерации аминокислот в антителе EU согласно Kabat.

Fc-участок охватывает домены, происходящие из константного участка иммуноглобулина, предпочтительно человеческого иммуноглобулина, в том числе фрагмента, аналога, варианта, мутанта или производного константного участка. Подходящие иммуноглобулины включают в себя IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и другие классы, такие как IgA, IgD, IgE и IgM. Константный участок иммуноглобулина определен как встречающийся в естественных условиях или полученный с помощью синтеза полипептид, гомологичный C-концевому участку иммуноглобулина, и он может включать в себя CH1-домен, шарнир, CH2-домен, CH3-домен или CH4-домен по отдельности или в комбинации.

Константный участок иммуноглобулина является ответственным за многие важные функции антитела, в том числе связывание с Fc-рецептором (FcR) и фиксация комплемента. Существуют пять основных классов константного участка тяжелой цепи, классифицируемых как IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, причем каждый из них имеет характерные эффекторные функции, определяемые изотипом. Например, IgG делится на четыре подкласса, известные как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Молекулы Ig взаимодействуют со многими классами клеточных рецепторов. Например, молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами Fcγ-рецепторов (FcγR), специфичных в отношении класса антител IgG, а именно с FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Сообщалось, что важные последовательности для связывания IgG с FcγR-рецепторами располагаются в CH2- и CH3-доменах. На период полувыведения антитела из

сыворотки оказывает влияние способность такого антитела к связыванию с Fc-рецептором (FcR).

В соответствии с определенными вариантами осуществления Fc-участок представляет собой вариантный Fc-участок, например последовательность Fc, которая была модифицирована (например, посредством аминокислотной замены, делеции и/или вставки) в сравнении с исходной последовательностью Fc (например, немодифицированным полипептидом Fc, который в дальнейшем модифицируют с получением варианта) для обеспечения желаемых структурных признаков и/или биологической активности.

Например, можно производить модификации в Fc-участке с целью получения варианта Fc, который (a) характеризуется повышенной или пониженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), (b) повышенной или пониженной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC), (c) характеризуется повышенной или пониженной аффинностью в отношении C1q и/или (d) характеризуется повышенной или пониженной аффинностью в отношении Fc-рецептора в сравнении с исходным Fc. Такие варианты Fc-участка обычно будут содержать по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в Fc-участке. Полагают, что комбинирование модификаций аминокислот будет особенно желательным. Например, вариантный Fc-участок может включать в себя две, три, четыре, пять замен и т.д., например, в конкретных положениях в Fc-участке, идентифицированных в настоящем документе.

Вариантный Fc-участок также может содержать изменение последовательности, при котором аминокислоты, задействованные в образовании дисульфидной связи, удаляют или заменяют на другие аминокислоты. Такое удаление может обеспечить избежание реакции с другими цистеинсодержащими белками, присутствующими в клетке-хозяине, применяемой для получения антител, описанных в настоящем документе. Даже когда цистеиновые остатки удалены, одноцепочечные Fc-домены все еще могут образовывать димерный Fc-домен, который удерживается вместе нековалентными взаимодействиями. В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-участок можно модифицировать, чтобы сделать его более совместимым с выбранной клеткой-хозяином. Например, можно удалить последовательность PA вблизи N-конца типичного нативного Fc-участка, которая может распознаваться расщепляющим ферментом в *E. coli*, таким как пролиниминопептидаза. В соответствии с другими вариантами осуществления можно удалить один или несколько сайтов гликозилирования в пределах Fc-домена. Остатки, которые, как правило, являются гликозилированными (например, аспарагин), могут обеспечивать цитолитическую реакцию. Такие остатки можно удалить или заменить негликозилированными остатками (например, аланином). В соответствии с другими вариантами осуществления сайты, задействованные во взаимодействии с комплементом, такие как сайт связывания C1q, можно удалить из Fc-участка. Например, можно удалить или заменить последовательность ЕКК в человеческом IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления можно удалить сайты, которые воздействуют на связывание с Fc-рецепторами, предпочтительно сайты, за исключением сайтов связывания рецептора реутилизации. В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-участок можно модифицировать с удалением сайта ADCC. Сайты ADCC являются известными в уровне техники; см., например, *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 (1992); применительно к сайтам ADCC в IgG1. Конкретные примеры вариантных Fc-доменов раскрыты, например, в международных заявках WO 97/34631 и WO 96/32478.

В соответствии с одним вариантом осуществления шарнирный участок Fc является модифицированным таким образом, чтобы число цистеиновых остатков в шарнирном участке было изменено, например повышено или понижено. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5677425 за авторством Bodmer и соавт. Число цистеиновых остатков в шарнирном участке Fc изменяют, например, для того, чтобы облегчить сборку легкой и тяжелой цепей, или чтобы повысить или понизить стабильность антитела. В соответствии с одним вариантом осуществления шарнирный участок Fc в антителе подвергают мутации для уменьшения периода полувыведения антитела из организма. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот вводят в участок на границе между CH2- и CH3-доменами в шарнирном фрагменте Fc таким образом, чтобы у антитела было нарушено связывание со стафилококковым белком А (SpA) в сравнении со связыванием нативного шарнирного домена Fc с SpA. Этот подход описан более подробно в патенте США № 6165745 за авторством Ward и соавт.

В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-участок изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка отличающимся аминокислотным остатком с изменением эффекторной функции(функций) антитела. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить отличающимся аминокислотным остатком так, чтобы антитело характеризовалось измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло способность к связыванию антигена как у исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого подвергается изменению, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент комплемента C1. Этот подход описан более подробно в патентах США №№ 5624821 и 5648260, оба за авторством Winter и соавт.

В другом примере одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменить отличающимся аминокислотным остатком таким образом, чтобы антитело характеризовалось измененным связыванием с C1q и/или пониженной или устраненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Этот подход описан более подробно в патенте США № 6194551 за авторством Idusogie и соавт.

В другом примере один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231 и 239 изменяют, чтобы посредством этого изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход дополнительно описан в РСТ публикации международной заявки WO 94/29351 за авторством Bodmer и соавт.

В еще одном примере Fc-участок можно модифицировать для повышения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для повышения аффинности в отношении Fc $\gamma$ -рецептора путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. Иллюстративные замены включают в себя 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Иллюстративные варианты включают в себя 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Другие модификации для усиления взаимодействий с Fc $\gamma$ R и комплементом включают в себя замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L, но не ограничиваются ими. Эти и другие модификации рассматриваются в Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691.

Модификации Fc, которые повышают связывание с Fc $\gamma$ -рецептором, включают в себя модификации аминокислот в любом одном или нескольких положениях аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 324, 327, 329, 330, 335, 337, 3338, 340, 360, 373, 376, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 в Fc-участке, причем нумерация остатков в Fc-участке соответствует нумерации аминокислот в антителе EU, как описано у Kabat (WO00/42072).

Другие модификации Fc, которые можно произвести в Fc, представляют собой модификации в отношении снижения или исключения связывания с Fc $\gamma$ R и/или белками комплемента, тем самым снижая или исключая опосредованные Fc эффекторные функции, такие как ADCC, ADCP и CDC. Иллюстративные модификации включают в себя замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, но не ограничиваются ими, причем нумерация соответствует нумерации аминокислот в антителе EU. Иллюстративные замены включают в себя 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R, но не ограничиваются ими, причем нумерация соответствует нумерации аминокислот в антителе EU. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для снижения взаимодействий с Fc $\gamma$ R и комплементом включают в себя замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V, а также удаление гликозилирования в положении 297 с помощью мутационных или ферментативных средств или при продуцировании в организмах, таких как бактерии, в которых белки не гликозилируются. Эти и другие модификации рассматриваются в Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691.

Необязательно, Fc-участок может содержать не встречающийся в естественных условиях аминокислотный остаток в дополнительных и/или альтернативных положениях, известных специалисту в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; РСТ публикации международных заявок WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114).

Также можно применять варианты Fc, которые усиливают аффинность в отношении ингибирующего рецептора Fc $\gamma$ RIIb. Такие варианты могут предполагать Fc-слитый белок с иммуномодулирующими активностями в отношении Fc $\gamma$ RIIb<sup>+</sup> клеток, в том числе, например, В-клеток и моноцитов. В соответствии с одним вариантом осуществления варианты Fc обеспечивают селективно повышенную аффинность к Fc $\gamma$ RIIb в сравнении с одним или несколькими активирующими рецепторами. Модификации для изменения связывания с Fc $\gamma$ RIIb включают в себя одну или несколько модификаций в положении, выбранном из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и 332 в соответствии с нумерацией аминокислот в антителе EU. Иллюстративные замены для усиления аффинности к Fc $\gamma$ RIIb включают в себя 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E, но не ограничиваются ими. Иллюстративные замены включают в себя 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для усиления связывания с Fc $\gamma$ RIIb включают 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E и 267E/328F.

Показатели аффинности и свойства связывания у Fc-участка в отношении его лиганда можно определить с помощью ряда методов *in vitro* анализа (биохимические или иммунологические анализы), известных в уровне техники, в том числе без ограничения методы оценки в равновесном состоянии (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммунологический анализ (RIA)) или методы оценки кинетических характеристик (например, анализ методом BIACORE), а также другие методы, такие как непрямые анализы связывания, анализы конкурентного ингибирования, резонансный

перенос энергии флуоресценции (FRET), электрофорез в геле и хроматографию (например, гель-фильтрацию). В этих и других методах может использоваться метка на одном или нескольких из оцениваемых компонентов, и/или в них может использоваться ряд методов выявления, включающих без ограничения хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей связывания и кинетических характеристик связывания можно найти в Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в которой делается упор на взаимодействие антитело-иммуноген.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело модифицируют для повышения его периода полувыведения из организма. Возможны различные подходы. Например, это может быть выполнено путем повышения аффинности связывания Fc-участка в отношении FcRn. Например, можно подвергнуть мутации один или несколько из следующих остатков: 252, 254, 256, 433, 435, 436, как описано в патенте США № 6277375. Конкретные иллюстративные замены включают в себя одну или несколько из следующих: T252L, T254S и/или T256F. В качестве альтернативы для повышения периода полувыведения из организма антитело можно подвергнуть изменениям в пределах CH1- или CL-участка, чтобы он содержал эпитоп, связывающийся с рецептором реутилизации, заимствованный из двух петель CH2-домена в Fc-участке IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 за авторством Presta и соавт. Другие иллюстративные варианты, которые повышают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают в себя замены в положениях 259, 308, 428 и 434, в том числе, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые повышают связывание Fc с FcRn, включают в себя: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua et al. *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). Другие модификации для модулирования связывания FcRn описаны в Yeung et al., 2010, *J Immunol*, 182:7663-7671. В соответствии с определенными вариантами осуществления можно применять гибридные изотипы IgG с конкретными биологическими характеристиками. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 можно сконструировать, заменяя соответствующие IgG1 положения в CH2- и/или CH3-участках аминокислотами из IgG3 в положениях, по которым два изотипа различаются. Следовательно, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В соответствии с другими вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, гибридный вариант IgG1/IgG2 можно сконструировать, заменяя соответствующие IgG2 положения в CH2- и/или CH3-участках аминокислотами из IgG1 в положениях, по которым два изотипа различаются. Следовательно, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например одну или несколько из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (относится к вставке глицина в положении 236) и 327A.

Более того, сайты связывания для FcγR1, FcγRII, FcγRIII и FcRn на человеческом IgG1 были нанесены на карту, а также были описаны варианты с улучшенным связыванием (см., Shields, R.L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Было показано, что конкретные мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Кроме того, было показано, что связывание с FcγRIII улучшено у мутантов со следующими комбинациями мутаций: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A, у которых, как было показано, проявляются усиленные связывание с FcγRIIIa и активность ADCC (Shields et al., 2001). Были идентифицированы другие варианты IgG1 с сильно повышенным связыванием с FcγRIIIa, в том числе варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, у которых было показано наибольшее повышение аффинности в отношении FcγRIIIa, понижение связывания FcγRIIb и сильная цитотоксическая активность у особей яванского макака (Lazar et al., 2006). Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфичное), трастузумаб (HER2/neu-специфичное), ритуксимаб (CD20-специфичное) и цетуксимаб (EGFR-специфичное) обуславливало значительно усиленную активность ADCC *in vitro*, а вариант S239D/I332E проявлял усиленную способность к сокращению количества В-клеток у обезьян (Lazar et al., 2006). Кроме того, мутанты IgG1, содержащие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, которые проявляли усиленное связывание с FcγRIIIa, и одновременно была идентифицирована усиленная активность ADCC у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий FcγRIIIa, в моделях В-клеточных злокачественных новообразований и злокачественной опухоли молочной железы (Stavenhagen et al., 2007; Nordstrom et al., 2011). Другие мутанты Fc, которые можно применять, включают S298A/E333A/L334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L и M428L/N434S.

В соответствии с определенными вариантами осуществления выбран Fc, который характеризуется пониженным связыванием с FcγR. Иллюстративный Fc, например Fc IgG1, с пониженным связыванием с FcγR содержит следующие три аминокислотные замены: L234A, L235E и G237A.

В соответствии с определенными вариантами осуществления выбран Fc, который характеризуется пониженной фиксацией комплемента. Иллюстративный Fc, например Fc IgG1, с пониженной фиксацией комплемента имеет следующие две аминокислотные замены: A330S и P331S.

В соответствии с определенными вариантами осуществления выбран Fc, у которого, по сути, отсутствует эффекторная функция, т.е. он характеризуется пониженным связыванием с FcγR и пониженной фиксацией комплемента. Иллюстративный Fc, например Fc IgG1, у которого отсутствует эффекторная функция, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. Иллюстративные тяжелые цепи, содержащие эти мутации, изложены в табл. 11.

При использовании константного домена IgG4 обычно предпочтительным является включение замены S228P, которая имитирует последовательность шарнира в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления гликозилирование антитела является модифицированным. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. антитело, лишенное гликозилирования). Гликозилирование можно подвергнуть изменениям, например, для повышения аффинности антитела в отношении антигена. Такие углеводные модификации можно выполнять, например, посредством изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, можно произвести одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят в результате к исключению одного или нескольких сайтов гликозилирования в каркасных участках вариабельного участка, тем самым исключая гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела в отношении антигена. Такой подход описан более подробно в патентах США № 5714350 и № 6350861 за авторством Co и соавт.

Гликозилирование константного участка по N297 можно предотвратить, подвергнув остаток N297 мутации в другой остаток, например N297A, и/или подвергнув мутации смежную аминокислоту, например 298, чтобы таким образом уменьшить гликозилирование по N297.

В качестве дополнения или альтернативы, можно получить антитело, которое характеризуется измененным типом гликозилирования, как, например, гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества фукозильных остатков, или антитело с повышенным содержанием структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления. Было продемонстрировано, что такие измененные паттерны гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Такие углеводные модификации можно выполнить, например, посредством экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным гликозилирующим аппаратом. Клетки с измененным гликозилирующим аппаратом были описаны в уровне техники, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела, описанные в настоящем документе, чтобы таким образом получить антитело с измененным гликозилированием. Например, в европейском патенте EP 1176195 за авторством Nanaï и соавт. описывается клеточная линия с нарушенным функционированием гена FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, таким образом, у антител, экспрессирующихся в такой клеточной линии, проявляется гипофукозилирование. В PCT публикации международной заявки WO 03/035835 за авторством Presta описывается вариант клеточной линии CHO, Lec13 клетки, с уменьшенной способностью к прикреплению фукозы к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит в результате к гипофукозилированию антител, экспрессирующихся в такой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В PCT публикации международной заявки WO 99/54342 за авторством Umana и соавт. описываются клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, такие антитела, экспрессирующиеся в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное содержание структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления, что приводит в результате к повышенной активности ADCC у антител (см. также, Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Другой модификацией антител, описанных в настоящем документе, является пегилирование. Антитело можно пегилировать, например, для увеличения периода полувыведения антитела из организма (например, из сыворотки). Для пегилирования антитела, как правило, осуществляют реакцию антитела или его фрагмента с полиэтиленгликолем (PEG), таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, при которых одна или несколько групп PEG становится прикрепленной к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно пегилирование выполняют посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с использованием реакционноспособной молекулы PEG (или аналогичного реакционноспособного водорастворимого полимера). Предполагается, что используемый в настоящем документе термин "полиэтиленгликоль" охватывает любую из форм PEG, которые использовались для получения производных других белков, как, например, моно(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, подлежащее пегилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Методы пегилирования белков известны в уровне техники, и их можно применять к антителам, описанным в настоящем документе; см., например, европейский патент EP 0154316 за авторством Nishimura и соавт. и европейский патент EP 0401384 за авторством Ishikawa и соавт.

VIII. Физические свойства антитела.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в переменном участке либо легкой, либо тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут приводить в результате к повышенной иммуногенности антитела или к изменению рК антитела вследствие измененного связывания с антигеном (Marshall et al. (1972) *Appl Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick et al. (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях было бы предпочтительно иметь антитело к GITR, которое не содержит гликозилирование в переменном участке. Этого можно достичь либо посредством селекции антител, которые не содержат мотив гликозилирования в переменном участке, либо посредством мутирования остатков в пределах участка гликозилирования.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, описанные в настоящем документе, не содержат сайты изомеризации аспарагина. Дезамидирование аспарагина может происходить в последовательностях N-G или D-G, и оно может приводить в результате к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, которая вносит изгиб в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело будет характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая обычно попадает в диапазон значений pH от 6 до 9,5. pI для антитела IgG1, как правило, попадает в пределы диапазона значений pH 7-9,5, и pI для антитела IgG4, как правило, попадает в пределы диапазона значений pH 6-8. Существует предположение, что антитела с pI за пределами нормального диапазона могут характеризоваться некоторым разворачиванием и нестабильностью в условиях *in vivo*. Следовательно, предпочтительно иметь антитело к GITR, которое имеет значение pI, которое попадает в нормальный диапазон. Этого можно достичь либо посредством селекции антител с pI в нормальном диапазоне, либо посредством мутирования заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело будет иметь характерную температуру плавления, причем более высокая температура плавления указывает на более высокую общую стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R. and Manning M.C. (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). В целом, предпочтительно, чтобы  $T_{M1}$  (температура начала разворачивания) была больше чем 60°C, предпочтительно больше чем 65°C, еще более предпочтительно больше чем 70°C. Температуру плавления антитела можно измерить с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al. (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления выбирают антитела, которые не разрушаются быстро. Разрушение антитела можно измерить с помощью капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A.J. and Hughes D.E. (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления выбирают антитела, которые характеризуются минимальными эффектами агрегации, которые могут приводить к запуску нежелательной иммунной реакции и/или к измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Обычно приемлемыми являются антитела с агрегацией, составляющей 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, еще более предпочтительно 15% или менее, еще более предпочтительно 10% или менее и еще более предпочтительно 5% или менее. Агрегацию можно измерить с помощью нескольких методик, в том числе с помощью колоночной гель-хроматографии (SEC), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и рассеяния света.

#### IX. Способы конструирования антител.

Как обсуждалось выше, антитела к GITR, имеющие последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , раскрытые в настоящем документе, можно применять для создания новых антител к GITR путем модификации последовательностей  $V_H$  и/или  $V_L$  или константного участка(участков), прикрепленного(прикрепленных) к ним. Таким образом, в соответствии с другим аспектом, описанным в настоящем документе, структурные признаки антитела к GITR, описанного в настоящем документе, например 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 и 6G10, применяют для создания структурно родственных антител к GITR, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител, описанных в настоящем документе, такое как связывание с человеческим GITR и GITR яванского макака. Например, один или несколько CDR участков в 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 и 6G10 или их мутантных вариантов можно объединить с известными каркасными участками и/или другими CDR с использованием методов на основе рекомбинации для создания дополнительных сконструированных с помощью методов на основе рекомбинации антител к GITR, описанный в настоящем документе, как обсуждалось выше. Другие типы модификаций включают в себя описанные в предыдущем разделе. Исходным материалом для способа конструирования являются одна или несколько из последовательностей  $V_H$  и/или  $V_L$ , представленных в настоящем документе, или один или несколько их CDR участков. Для создания сконструированного антитела не нужно фактически получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или несколько из последовательностей  $V_H$  и/или  $V_L$ , представленных в настоящем документе, или один или несколько их CDR участков. Предпочтительнее, информация, содержащаяся в последовательности(последовательностях) используют в качестве исходного материала для создания по-

следовательности(последовательностей) "второго поколения", происходящих из исходной последовательности(последовательностей), а затем последовательность(последовательности) "второго поколения" получают и экспрессируют в виде белка.

Соответственно в настоящем документе предполагаются способы получения антитела к GITR, предусматривающие:

(а) обеспечение: (i) последовательности варибельного участка тяжелой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 33, 46, 62, 78, 91, 106, 122, 138 и 342, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 34, 47, 63, 79, 92, 107, 123, 139 и 343, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 35, 48, 64, 80, 93, 108, 124, 140 и 344; и (ii) последовательности варибельного участка легкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 36, 49, 65, 68, 81, 94, 109, 112, 125, 141, 144 и 345, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 37, 50, 66, 69, 82, 95, 110, 113, 126, 142, 145 и 346, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 38, 51, 67, 70, 83, 96, 111, 114, 127, 143, 146 и 347;

(b) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в пределах последовательности варибельного участка тяжелой цепи антитела и/или последовательности варибельного участка легкой цепи антитела с созданием по меньшей мере одной измененной последовательности антитела; и

(c) экспрессию измененной последовательности антитела в виде белка.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела можно применять стандартные методики молекулярной биологии.

Предпочтительно антитело, кодируемое измененной последовательностью(последовательностями) антитела, представляет собой антитело, которое сохраняет одно, некоторые или все из функциональных свойств антител к GITR, описанных в настоящем документе, которые включают в себя:

(1) связывание с растворимым человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода Вiasoge;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $K_D$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении по Скэтчарду;

(3) связывание с мембраносвязанным человеческим GITR, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ), например, при измерении с помощью FACS;

(4) связывание с GITR яванского макака, например связывание с мембраносвязанным GITR яванского макака, например с  $EC_{50}$ , составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью метода FACS;

(5) индукцию или усиление активации Т-клеток, как, например, при наличии включения CD3 (например, при наличии субоптимальных концентраций антитела к CD3), что подтверждается (i) повышенной продукцией IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в экспрессирующих GITR Т-клетках и/или (ii) усиленной пролиферацией Т-клеток;

(6) индукцию или усиление активации Т-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур;

(7) ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на 3A9-hGITR клетках, например с  $EC_{50}$ , составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS;

(8) не более чем частичное ингибирование связывания лиганда GITR с GITR на активированных Т-клетках;

(9) связывание с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4), например с прерывающемся эпитопом в пределах аминокислотных последовательностей PTGG-PGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218);

(10) связывание как с О-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR;

(11) наличие агонистической активности в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность; и

(12) конкуренцию в любом из направлений или в обоих направлениях за связывание с человеческим GITR с 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и/или 6G10.

Измененное антитело может проявлять одно или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, одиннадцать или все из функциональных свойств, изложенных в пп.(1)-(12) выше. Функциональные свойства измененных антител можно оценить с помощью стандартных анализов, доступных в уровне техники и/или описанных в настоящем документе, как, например, анализов, изложенных в разделе "Примеры" (например, ELISA, FACS).

В соответствии с определенными вариантами осуществления способов конструирования антител, описанных в настоящем документе, мутации можно вводить произвольно или селективно по всей кодирующей последовательности антитела к GITR или ее части и полученные в результате модифицированные антитела к GITR можно подвергнуть скринингу в отношении активности связывания и/или других

функциональных свойств, которые описаны в настоящем документе. Способы введения мутаций были описаны в уровне техники. Например, в РСТ публикации международной заявки WO 02/092780 за авторством Short описываются способы создания и скрининга мутаций в антителе с использованием насыщающего мутагена, сборки с лигированием синтетических фрагментов или их комбинации. В качестве альтернативы в РСТ публикации международной заявки WO 03/074679 за авторством Lazar и соавт. описываются способы с использованием компьютерных методов скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

Х. Молекулы нуклеиновой кислоты.

Другой аспект, описанный в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитела, описанные в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенном или практически чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "сделанной практически чистой", если она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков, с помощью стандартных методик, в том числе щелочной обработки/обработки SDS, центрифугирования в градиенте плотности CsCl, воздействия рестрикционных ферментов, колоночной хроматографии, электрофореза в агарозном геле и других методик, широко известных в уровне техники; см., F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, можно получить с использованием стандартных методик молекулярной биологии. В случае антител, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными из трансгенных мышей, несущих гены человеческого иммуноглобулина, как дополнительно описано ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, производимого гибридомой, можно получить с помощью стандартных методик ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. В случае антител, получаемых из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с использованием методик фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделить из библиотеки.

Предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе, являются молекулы, кодирующие последовательности  $V_H$  и  $V_L$  в моноклональных антителах 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности  $V_H$  в 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 и 6G10, изложены в SEQ ID NO: 147, 154, 158, 162, 168, 172, 176, 182, 186 и 353 соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности  $V_L$  в 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10, изложены в SEQ ID NO: 148, 155, 163, 164, 169, 173, 177, 178, 183, 187, 188 и 354 соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности тяжелой цепи в 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 и 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 и 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 и 19H8-2) и 6G10, изложены в SEQ ID NO: 149, 156, 160, 165, 170, 174, 179, 184, 189 и 355 соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности легкой цепи в 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10, изложены в SEQ ID NO: 150, 157, 161, 166, 167, 171, 175, 181, 180, 185, 190, 191 и 356 соответственно.

Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие зрелые  $V_H$  и  $V_L$  домены в антителах 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1 (тот же вариабельный участок), изложены как SEQ ID NO: 147 и 148 соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие зрелые тяжелые цепи в антителах 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1, изложены как SEQ ID NO: 151 и 152 соответственно, а иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие зрелые легкие цепи в антителах 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1, изложены как SEQ ID NO: 153.

Иллюстративные  $V_H$  и  $V_L$  домены антител 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1 (тот же вариабельный участок) с сигнальным пептидом изложены как SEQ ID NO: 357 и 358 соответственно, и кодирующие их нуклеотидные последовательности изложены как SEQ ID NO: 359 и 360 соответственно.

Иллюстративные тяжелые цепи антител 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1 с сигнальным пептидом изложены как SEQ ID NO: 361 и 362 соответственно, а иллюстративные нуклеотидные последовательности, кодирующие их, изложены как SEQ ID NO: 363 и 364 соответственно. Иллюстративная легкая цепь антител 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1 с сигнальным пептидом изложена как SEQ ID NO: 365, а иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая ее, изложена как SEQ ID NO: 366.

Способ получения 28F3.IgG1 может предусматривать экспрессию тяжелой цепи и легких цепей в клеточной линии, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи с сигнальным пептидом, например SEQ ID NO: 363 и 365 соответственно. Способ получения 28F3.IgG1.1 может предусматривать экспрессию тяжелой цепи и легких цепей в клеточной линии, содержащей нук-

леотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи с сигнальным пептидом, например SEQ ID NO: 364 и 366 соответственно. В настоящем документе также охватываются клетки-хозяева, содержащие эти нуклеотидные последовательности.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих  $V_H$  и  $V_L$  сегменты, эти фрагменты ДНК можно подвергнуть дополнительной манипуляции с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов варибельного участка в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. При этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий  $V_L$  или  $V_H$ , является функционально связанным с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константный участок антитела или гибкий линкер. Предполагается, что термин "функционально связанный" при использовании в данном контексте означает, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются в одной рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую  $V_H$  участок, можно превратить в ген полноразмерной тяжелой цепи, обеспечив функциональную связь ДНК, кодирующей  $V_H$ , с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константного участка тяжелой цепи человека известны в уровне техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти участки, можно получить с помощью стандартной ПНР-амплификации. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой константный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например участок IgG1. В случае гена Fab-фрагмента тяжелой цепи ДНК, кодирующая  $V_H$ , может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только CH1 в константном участке тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую  $V_L$  участок, можно превратить в ген полноразмерной легкой цепи (также как и ген легкой цепи Fab), обеспечив функциональную связь ДНК, кодирующей  $V_L$ , с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок легкой цепи,  $C_L$ . Последовательности генов константного участка легкой цепи человека известны в уровне техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти участки, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок легкой цепи может представлять собой константный участок каппа- или лямбда-цепи.

Для создания гена scFv обеспечивают функциональную связь фрагментов ДНК, кодирующих  $V_H$  и  $V_L$ , с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующим аминокислотную последовательность  $(Gly_4-Ser)_3$ , таким образом, чтобы последовательности  $V_H$  и  $V_L$  могли экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка с  $V_L$  и  $V_H$  участками, соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-5541).

В настоящем документе также предполагаются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , которые являются гомологичными таким последовательностям в моноклональных антителах 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10. Иллюстративные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , которые по меньшей мере на 70% идентичны, например по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичны молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим последовательности  $V_H$  и  $V_L$  в моноклональных антителах 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10. В настоящем документе также предполагаются молекулы нуклеиновой кислоты с консервативными заменами (т.е. заменами, которые не изменяют образующуюся в результате аминокислотную последовательность после трансляции молекулы нуклеиновой кислоты), например, для оптимизации кодонов.

#### XI. Получение антител.

Моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, можно получить с использованием ряда известных методик, таких как стандартная методика гибридизации соматических клеток, описанная Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Несмотря на то что предпочтительными являются процедуры гибридизации соматических клеток, в принципе, для получения моноклональных антител также можно использовать другие методики, например вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов, методики фагового дисплея с использованием библиотек генов человеческих антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышиная система. Получение гибридом у мыши является хорошо отлаженной процедурой. Протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в уровне техники. Также известны клетки-партнеры для слияния (например, клетки миеломы мыши) и процедуры слияния.

Химерные или гуманизированные антитела, описанные в настоящем документе, можно получить на основе последовательности мышиного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующие иммуноглобулины с тяжелой и легкой цепями можно получить из представляющей интерес мышиной гибридомы, и их можно сконструировать таким образом, чтобы они содержали после-

довательности иммуноглобулина, не являющиеся мышинными (например, человеческие), с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышинные вариабельные участки можно связать с человеческими константными участками с помощью методов, известных в уровне техники (см., например, патент США № 4816567 за авторством Cabilly и соавт.). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR участки можно вставить в человеческий каркас с использованием методов, известных в уровне техники (см., например, патент США № 5225539 за авторством Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen и соавт.).

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против GITR, можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части человеческой иммунной системы вместо мышинной системы. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в настоящем документе HuMAb-мышами и KM-мышами соответственно, и которые собирательно называются в настоящем документе "мышы с человеческим Ig".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы с генами человеческого иммуноглобулина, которые кодируют не подвергшиеся перегруппировке последовательности тяжелой ( $\mu$  и  $\gamma$ ) и к-легкой цепей человеческого иммуноглобулина, вместе с целенаправленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы  $\mu$ - и к-цепей (см., например, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Соответственно мыши проявляют пониженную экспрессию мышинового IgM или к, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены человеческих тяжелой и легкой цепей подвергаются переключению класса и соматической мутации с образованием высокоаффинных моноклональных человеческих IgGк (Lonberg, N. et al. (1994), выше; обсуждается в Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и в Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и применение HuMAb-мышей и геномных модификаций, которые несут такие мыши, дополнительно описано в Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591 и Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, причем содержание каждого из данных источников специально включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте; см., кроме того, патенты США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429, все за авторством Lonberg и Кау; патент США № 5545807 за авторством Surani и соавт.; РСТ публикации международных заявок №№ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все за авторством Lonberg и Кау; и РСТ публикацию международной заявки № WO 01/14424 за авторством Korman и соавт.

В соответствии с определенными вариантами осуществления выработку антител, описанных в настоящем документе, индуцируют с использованием мыши, которая несет последовательности человеческого иммуноглобулина в трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи. Такие мыши, называемые в настоящем документе "KM-мышами", подробно описаны в РСТ публикации международной заявки WO 02/43478 за авторством Ishida и соавт.

Кроме того, в уровне техники доступны альтернативные системы на основе трансгенных животных, экспрессирующих гены человеческих иммуноглобулинов, и их можно использовать для индукции выработки антител к GITR, описанных в настоящем документе. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 за авторством Kucherlapati и соавт.

Более того, в уровне техники доступны альтернативные системы на основе трансхромосомных животных, экспрессирующих гены человеческих иммуноглобулинов, и их можно использовать для индукции выработки антител к GITR, описанных в настоящем документе. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому с человеческой тяжелой цепью, так и трансхромосому с человеческой легкой цепью, называемых "ТС-мышами"; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Более того, в уровне техники были описаны коровы, несущие трансхромосомы с человеческими тяжелой и легкой цепями (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894), и их можно использовать для индукции выработки антител к GITR, описанных в настоящем документе.

Дополнительные описанные в уровне техники мышинные системы для индукции выработки человеческих антител, например человеческих антител к GITR, включают в себя (i) мышь VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), у которой эндогенные мышинные вариабельные участки тяжелой и легкой цепей были заменены посредством гомологичной рекомбинации на человеческие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными мышинными константными участками таким образом, чтобы у мышей индуцировалась выработка химерных антител (человеческий

V/мышинный C), а затем их превращают в полностью человеческие антитела с помощью стандартных методик с использованием рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), где мышь содержит не подвергшиеся перегруппировке переменные участки тяжелой цепи человека, но также подвергшийся перегруппировке обычный человеческий переменный участок легкой цепи. Такие мыши и их применение для индукции выработки антител описаны, например, в патентных заявках WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Человеческие моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, также можно получить с использованием методов фагового дисплея для скрининга библиотек генов человеческих иммуноглобулинов. Такие методы фагового дисплея для выделения человеческих антител являются общепринятыми в данной области техники; см., например, патенты США №№ 5223409; 5403484 и 5571698 за авторством Ladner и соавт.; патенты США №№ 5427908 и № 5580717 за авторством Dower и соавт.; патенты США №№ 5969108 и 6172197 за авторством McCafferty и соавт. и патенты США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 за авторством Griffiths и соавт.

Человеческие моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, также можно получить с использованием SCID-мышей, в которых были воссозданы человеческие иммунные клетки таким образом, чтобы при иммунизации в качестве ответа могли продуцироваться человеческие антитела. Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5476996 и 5698767 за авторством Wilson и соавт.

#### Иммунизации.

Для получения полностью человеческих антител к GITR, трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих гены человеческих иммуноглобулинов (например, HCo12, HCo7 или KM-мышей), можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом антигена GITR и/или клетками, экспрессирующими GITR или его фрагмент, как описано для других антигенов, например, в Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; и в международной заявке WO 98/24884. В качестве альтернативы мышам можно иммунизировать ДНК, кодирующей человеческий GITR или его фрагмент. Предпочтительно при первой инфузии мыши будут иметь возраст 6-16 недель. Например, очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) рекомбинантного антигена GITR можно использовать для внутрибрюшинной иммунизации HuMAb-мышей. В том случае, если иммунизации с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена GITR не приводят в результате к образованию антител, мышам также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими GITR, например, из клеточной линии, для стимуляции иммунных реакций. Иллюстративные клеточные линии включают в себя сверхэкспрессирующие GITR стабильные клеточные линии CHO и Raji.

Накопленный опыт с использованием различных антигенов показал, что трансгенные мыши HuMAb реагируют наилучшим образом, когда первоначально их иммунизируют внутрибрюшинно (IP) или подкожно (SC) антигеном с адьювантом Райби с последующими IP/SC иммунизациями раз в две недели (в общей сложности до 10) антигеном в адьюванте Райби. Иммунные реакции можно отслеживать в ходе выполнения протокола иммунизации с использованием образцов плазмы, полученных из крови, забранной из ретроорбитального синуса. Плазму можно подвергать скринингу с помощью методов ELISA и FACS (как описано ниже), и мышам с достаточными титрами иммуноглобулина человеческого антитела к GITR можно использовать для слияний. Мышам можно подвергнуть бустер-иммунизации антигеном внутривенно за 3 суток до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Ожидается, что может быть необходимо осуществление 2-3 слияний для каждой иммунизации. Каждым антигеном иммунизируют, как правило, от 6 до 24 мышам. Обычно используют линии HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, оба трансгена HCo7 и HCo12 можно ввести посредством скрещивания в одну мышь, имеющую два разных трансгена человеческой тяжелой цепи (HCo7/HCo12).

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к GITR Для получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов из иммунизированных мышам можно выделить и подвергнуть слиянию с соответствующей линией иммортализованных клеток, такой как линия клеток миеломы мышам. Полученные в результате гибридомы можно подвергнуть скринингу в отношении продукции антигенспецифичных антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки из иммунизированных мышам можно подвергнуть слиянию с Sp2/0 клетками несекретирующей миеломы мышам (ATCC, CRL 1581) с использованием 50% PEG. Клетки высаживали в количестве примерно  $2 \times 10^5$  в плоскодонный микротитровальный планшет с последующим двухнедельным инкубированием в селективной среде, содержащей 10% фетальной сыворотки (fetal Clone Serum), 18% кондиционированной среды "653", 5% реактива origen (IGEN), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пируват натрия, 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1X НАТ (Sigma). Примерно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой НАТ заменен на НТ. Затем отдельные лунки можно подвергнуть скринингу в отношении человеческих моноклональных антител IgM и IgG с помощью метода ELISA. Если имеет место существенный рост гибридомы, среду можно подвергнуть наблюдению через 10-14 суток. Гибридомы, секретирующие антитело, можно пере-

садить, вновь подвергнуть скринингу и, если они все еще являются положительными в отношении человеческого IgG, моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды при использовании метода серийных разведений. Стабильные субклоны можно затем культивировать *in vitro* с получением небольших количеств антитела для характеристики в среде для тканевой культуры.

Чтобы очистить человеческие моноклональные антитела, отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно профильтровать и концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного на сефарозе белка А (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG можно подвергнуть проверке с помощью электрофореза в геле и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы гарантировать чистоту. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить по OD280 (оптической плотности при длине волны 280 нм) с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к GITR Антитела можно продуцировать в трансфектоме на основе клетки-хозяина, например, с помощью комбинации методик с использованием рекомбинантной ДНК и методов трансфекции генов, которые широко известны в уровне техники (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов данных антител ДНК, кодирующие часть легкой и тяжелой цепей или полноразмерные легкую и тяжелую цепи, можно получить с помощью стандартных методик молекулярной биологии (например, ПНР-амплификации или клонирования кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует антитело, представляющее интерес) и ДНК можно встроить в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были функционально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В данном контексте термин "функционально связанный", как предполагается, означает, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторе выполняют свою целевую функцию, заключающуюся в регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Вектор экспрессии и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или оба гена встроены в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела встраивают в вектор(векторы) экспрессии с помощью стандартных методов (например, лигирования комплементарных сайтов рестрикции в фрагмент гена антитела и вектор или лигирования тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют). Варибельные участки легкой и тяжелой цепи в антителах, описанных в настоящем документе, можно применять для создания генов полноразмерного антитела для антител любого изотипа посредством встраивания этих варибельных участков в векторы экспрессии, уже кодирующие константные участки тяжелой цепи и константные участки легкой цепи желаемого изотипа, таким образом, чтобы  $V_H$  сегмент был функционально связан с  $C_H$  сегментом(сегментами) в векторе, а  $V_L$  сегмент был функционально связан с  $C_L$  сегментом в векторе.

В качестве дополнения или альтернативы, рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан в одной рамке считывания с аминоконцом в гене цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления можно использовать следующие сигнальные пептиды из тяжелой и легкой цепей человеческого антитела:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315); MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS (SEQ ID NO: 321); MEFGLNWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 327); MEFGLSWIFLAAILKGVQC (SEQ ID NO: 329); MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS (SEQ ID NO: 333); MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 323); MEAPAQLLFLLLWLPDPTTG (SEQ ID NO: 325); MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317); MRVLAQLLGLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 319) и METPAQLLFLLLWLPDPTTG (SEQ ID NO: 331).

Тяжелую и легкую цепи антител к GITR можно экспрессировать с соответствующей сигнальной последовательностью, которая была связана с каждой цепью в гибридоме, из которой их клонировали. Ниже приведены сигнальные последовательности различных антител к GITR, которые присутствуют в гибридоме, из которой их клонировали, причем данные сигнальные последовательности можно использовать для экспрессии того же антитела или другого антитела.

- Сигнальная последовательность VH 28F3:  
MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)  
ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCCTGTTGCTCTTTAAGAGGTGTCCAG  
TGT (SEQ ID NO: 316)
- Сигнальная последовательность VL 28F3:  
MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)  
ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA  
GGTGCCAGAT (SEQ ID NO: 318)
- Сигнальная последовательность VH 18E10:  
MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)  
ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCCTGTTGCTCTTTAAGAGGTGTCCAG  
TGT (SEQ ID NO: 316)
- Сигнальная последовательность VL 18H10:  
MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 317)  
ATGGACATGAGGGTCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTCCCA  
GGTGCCAGAT (SEQ ID NO: 318)
- Сигнальная последовательность VH 19D3:  
MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)  
ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCCTGTTGCTCTTTAAGAGGTGTCCAG  
TGT (SEQ ID NO: 316)
- Сигнальная последовательность VL 19D3:  
MRVLAQLLGLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 319)  
ATGAGGGTCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTCCAGGTGCC  
AGATGT (SEQ ID NO: 320)
- Сигнальная последовательность VH 3C3:  
MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 321)  
ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTCTGT  
TCC (SEQ ID NO: 322)
- Сигнальная последовательность VL1 3C3:  
MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 323)  
ATGGACATGAGGGTCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTCCCA  
GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 324)
- Сигнальная последовательность VL2 3C3:  
MEAPAQLLFLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 325)  
ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACC  
ACCGGA (SEQ ID NO: 326)
- Сигнальная последовательность VH 8A6:  
MEFGLNWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 327)  
ATGGAGTTTGGGCTGAACTGGGTTTTCTCCTGTTGCTCTTTAAGAGGTGTCCAG  
TGT (SEQ ID NO: 328)
- Сигнальная последовательность VL 8A6:  
MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)  
ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA  
GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 318)
- Сигнальная последовательность VH 9G7:  
MEFGLSWIFLAAILKGVQC (SEQ ID NO: 329)  
ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATTTCTCCTGCTGCTATTTAAAAGGTGTCCAG  
TGT (SEQ ID NO: 330)
- Сигнальная последовательность VL1 и VL2 9G7:  
METPAQLLFLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 331)  
ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACC  
ACCGGA (SEQ ID NO: 332)
- Сигнальная последовательность VH 14E3:  
MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 333)  
ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTCTGT  
TCC (SEQ ID NO: 334)

Сигнальная последовательность VL 14E3:

MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO: 323)

ATGGACATGAGGGTCCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTCCCA

GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 324)

Сигнальная последовательность VH 19H8:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAG

TGT (SEQ ID NO: 316)

Сигнальная последовательность VL1 19H8:

MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA

GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 318)

Сигнальная последовательность VL2 19H8:

MEAPAQLLFLLLWLPTTG (SEQ ID NO: 325)

ATGGAAGCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACC

ACCGGA (SEQ ID NO: 326)

Сигнальная последовательность VH 6G10:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAG

TGT (SEQ ID NO: 316)

Сигнальная последовательность VL 6G10:

MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA

GGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 318)

Сигнальную последовательность MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 367) можно использовать для экспрессии тяжелой и легкой цепей.

Тяжелую и легкую цепи или их части, такие как приведенные в табл. 11, можно связать с сигнальной последовательностью, представленной в настоящем документе. Например, тяжелая цепь 28F3 или ее варибельный участок, например, содержащий SEQ ID NO: 13, 15, 17 или 18, можно связать или слить с сигнальным пептидом, содержащим или состоящим из MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 315) или MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 367). Легкую цепь 28F3 или ее варибельный участок, например, содержащий SEQ ID NO: 14, 16 или 19, можно связать или слить с сигнальным пептидом, содержащим или состоящим из MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 317) или MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 367).

Помимо генов цепей антитела, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Предполагается, что термин "регуляторная последовательность" включает в себя промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалисту в данной области техники будет понятно, что построение вектора экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине из млекопитающего животного включают в себя вирусные элементы, которые приводят к высоким уровням экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, большой поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. В качестве альтернативы можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или Р-глобиновый промотор. Кроме того, регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из разных источников, такие как промоторная система SRa, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор из вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Помимо генов цепей антитела и регуляторных последовательностей, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективируемых маркеров. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, все за авторством Axel и соавт.). Например, как правило, ген селективируемого маркера придает клетке-хозяину, в которую был введен вектор, устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. Предпочтительные гены селективируемых маркеров включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для ис-

пользования в dhfr- клетках-хозяевах с селекцией/увеличением численности с использованием метотрексата) и ген neo (для селекции с использованием G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей вектор(векторы) экспрессии, кодирующий(е) тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных методик. Различные формы термина "трансфекция", как предполагается, охватывают широкий спектр методик, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяин, например электропорацию, осаждение с фосфатом кальция, трансфекцию с использованием DEAE-декстрана (диэтил-аминоэтилдекстран) и т.п. Несмотря на то что теоретически возможно экспрессировать антитела, описанные в настоящем документе в любой из прокариотических или эукариотических клеток-хозяев, экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно в клетках-хозяевах из млекопитающего животного является наиболее предпочтительной, поскольку сборка и секреция свернутого надлежащим образом и иммунологически активного антитела в таких эукариотических клетках и, в частности, в клетках млекопитающего более вероятна, чем в прокариотических клетках. Прокариотическая экспрессия генов антитела, как сообщалось, является неэффективной для получения высоких выходов активного антитела (Boss, M.A. And Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Предпочтительные клетки-хозяева из млекопитающего животного для экспрессии рекомбинантных антител, описанных в настоящем документе, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (в том числе dhfr-CHO клетки, описанные в Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, используемые с селектируемым маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 759:601-621), миеломные NSO клетки, COS клетки и SP2 клетки. В частности, для применения с миеломными NSO клетками другой предпочтительной системой экспрессии является GS система экспрессии генов, раскрытая в патентных документах WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Если рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева из млекопитающего животного, антитела продуцируются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно для секреции антитела в среду культивирования, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела можно выделять из среды культивирования с использованием стандартных методов очистки белков.

## XII. Анализы.

Антитела, описанные в настоящем документе, можно исследовать в отношении связывания с G1TR, например, с помощью стандартного метода ELISA. Вкратце, микротитровальные планшеты покрывают очищенным G1TR в концентрации 1-2 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Разведенные пробы антитела (например, разведенные пробы плазмы из иммунизированных G1TR мышей) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывают PBS/Tween, а затем инкубируют со вторичным реактивом (например, в случае человеческих антител, с Fc-специфичным поликлональным реактивом на основе козьего антитела к человеческому IgG), конъюгированном с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты проявляют с использованием субстрата ABTS (Moss Inc, продукт: ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Образцы сыворотки из иммунизированных мышей затем подвергают дополнительному скринингу с помощью проточной цитометрии в отношении связывания с клеточной линией, экспрессирующей человеческий G1TR, а не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует G1TR. Вкратце, связывание антител к G1TR оценивают путем инкубирования экспрессирующих G1TR CHO клеток с антителом к G1TR при разведении 1:20. Клетки промывают и связывание выявляют с использованием меченого PE Ab к человеческому IgG Проточно-цитометрические анализы осуществляют с использованием проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния). Предпочтительно мышей, у которых проявляются наиболее высокие титры, будут использовать для слияний.

Анализ ELISA, который описан выше, можно использовать для скрининга в отношении антител и, следовательно, гибридом, которые продуцируют антитела, проявляющие положительную реактивность с иммуногеном G1TR. Гибридомы, продуцирующие антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с G1TR, можно затем субклонировать и дополнительно охарактеризовать. Затем можно выбрать один клон от каждой гибридомы, который сохраняет реактивность родительских клеток (с помощью ELISA), для создания банка клеток и для очистки антитела.

Для очистки антител к G1TR отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно профильтровать и концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного на сефарозе белка А (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG можно подвергнуть проверке с помощью электрофореза в геле и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы гарантировать чистоту. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить по OD<sub>280</sub> с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликваты и хранить при -80°C.

Для того чтобы определить, связываются ли отобранные моноклональные антитела к G1TR с уни-

кальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реактивов (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Связывание биотинилированных МАb можно выявить с использованием меченного стрептавидином зонда. Исследования конкуренции с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно осуществлять с использованием покрытых G1TR планшетов для ELISA, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител можно провести ELISA анализы на изотип с использованием реактивов, специфичных в отношении антител конкретного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела лунки микротитровальных планшетов можно покрыть антителом к человеческому иммуноглобулину в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% BSA в планшетах осуществляют реакцию с исследуемыми моноклональными антителами или очищенными изотипическими контролями в концентрации 1 мкг/мл или менее при температуре окружающей среды в течение 1-2 ч. В лунках затем можно осуществлять реакцию со специфичными либо к человеческому IgG1, либо к человеческому IgM зондами, конъюгированными со щелочной фосфатазой. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Для исследования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими G1TR, можно использовать проточную цитометрию, как описано в разделе "Примеры". Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие мембраносвязанный G1TR (выращиваемые при стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA, при 4°C в течение 1 ч. После промывания осуществляют реакцию клеток с меченым флуоресцеином антителом к IgG в тех же условиях, что и окрашивание первичным антителом. Образцы можно анализировать с помощью инструмента FACScan с использованием свойств переднего и бокового светорассеяния для установки гейта на отдельные клетки, и определяют связывание меченых антител. Можно использовать альтернативный анализ с помощью флуоресцентной микроскопии (в дополнение к проточнocyтoметрическому анализу или вместо него). Клетки можно окрашивать точно так же, как описано выше, и оценивать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот метод обеспечивает возможность визуализации отдельных клеток, но может иметь уменьшенную чувствительность в зависимости от плотности антигена.

Антитела к G1TR можно дополнительно исследовать в отношении способности реагировать с антигеном G1TR с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, можно получить клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих G1TR, и подвергнуть их электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены перенесут на нитроцеллюлозные мембраны, будут блокировать 20% мышиной сывороткой и пометят моноклональным антителом, подлежащим анализу. Связывание с IgG можно выявить с использованием щелочной фосфатазы, пришитой к антителу к IgG, и проявить с использованием таблеток с субстратом BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луис, Миссури).

Методы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетических характеристик связывания у различных антител к G1TR включают в себя стандартные анализы, известные в уровне техники, например анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) методом Biacore™ с использованием инструмента Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Уппсала, Швеция).

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело специфично связывается с внеклеточным участком человеческого G1TR Антитело может специфично связываться с конкретным доменом (например, функциональным доменом) в пределах внеклеточного домена G1TR В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитело специфично связывается с сайтом на G1TR, с которым связывается G1TR-L. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело специфично связывается с внеклеточным участком человеческого G1TR и внеклеточным участком G1TR яванского макака. Предпочтительно антитело связывается с человеческим G1TR с высокой аффинностью.

### XIII. Иммуноконъюгаты, производные антитела и диагностические средства на основе антитела.

Антитела, описанные в настоящем документе, можно применять для диагностических целей, в том числе для анализа образцов и *in vivo* визуализации, и для этого антитело (или его связывающий фрагмент) можно конъюгировать с соответствующим выявляемым средством с образованием иммуноконъюгата. В случае диагностических целей соответствующими средствами являются выявляемые метки, которые включают в себя радиоактивные изотопы для визуализации всего тела и радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие маркирующие антитело элементы для анализа образцов.

Выявляемые метки могут относиться к различным типам, используемым в настоящее время в области *in vitro* диагностики, включая метки на основе частиц, в том числе золи металлов, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как  $I^{125}$  или  $Tc^{99}$ , присутствующие, например, с пептидным хелатирующим средством типа  $N_2S_2$ ,  $N_3S$  или  $N_4$ , хромофоры, в том числе флуоресцентные маркеры, люминесцентные маркеры, фосфоресцирующие маркеры и т.п., а также ферментные метки, которые превращают заданный субстрат в выявляемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые выявляются после амплификации, такой как полимеразная цепная реакция. Подходящие ферментные метки включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.п. Например, метка может представлять собой фермент щелочную фос-

фатазу, выявляемую посредством измерения наличия или появления хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантил-метокси-фосфорилокси-фенилдиоксетан (AMPPD), динатрия 3-(4-(метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1 3,7}декан}-4-ил)фенилфосфат (CSPD), а также CDP и CDP-star® или других люминесцентных субстратов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например хелатов подходящих лантаноидов, таких как тербий(III) и европий(III). Средства для выявления определяются выбранной меткой. Появление метки или продуктов ее реакции можно оценить невооруженным глазом в случае, когда метка представляет собой материал в виде частиц и накапливается на соответствующих уровнях, или с использованием инструментов, таких как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т.п., причем все они соответствуют стандартной практике.

Предпочтительно методы конъюгации приводят в результате к связям, которые являются практически (или почти) неиммуногенными, например пептидные- (т.е. амидные-), сульфидные-, (стерически затрудненные), дисульфидные-, гидразоновые- и эфирные связи. Эти связи являются почти неиммуногенными и проявляют приемлемую стабильность в сыворотке (см., например, Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; международные заявки WO 2009/059278; WO 95/17886).

В зависимости от химической природы фрагмента и антитела можно использовать разные стратегии конъюгирования. В случае, если фрагмент является встречающимся в естественных условиях или рекомбинантным и имеет длину 50-500 аминокислот, существуют стандартные процедуры в пособиях, описывающих химические особенности синтеза белковых конъюгатов, которым легко может следовать специалист в данной области техники (см., например, Hackenberger, C.P.R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). В соответствии с одним вариантом осуществления используется реакция малеинимидо-фрагмента с цистеиновым остатком в антителе или фрагменте. Она является особенно подходящим связывающим химическим процессом в случае использования, например, Fab или Fab'-фрагмента антитела. В качестве альтернативы в соответствии с одним вариантом осуществления выполняют связывание с С-концом антитела или фрагмента. С-Концевую модификацию белка, например Fab-фрагмента, можно выполнить, например, как описано в источнике (Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

В целом, сайт-специфичная реакция и ковалентное связывание основываются на превращении природной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая является нетипичной для реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в редком контексте последовательности может подвергаться ферментативному превращению в альдегид (см. Frese, M.A., и Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427). Также возможно получить желательную модификацию аминокислоты при использовании специфичной ферментативной активности определенных ферментов в отношении реакции с природной аминокислотой в заданном контексте последовательности (см., например, Taki, M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al. *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; и катализируемого протеазой образования С--N связей, используемого Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403).

Сайт-специфичной реакции и ковалентного связывания также можно достичь с помощью селективной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами.

Способность N-концевого цистеина к реакции с бензонитрилами (см., Ren, H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) можно использовать для достижения сайт-специфичного ковалентного связывания.

Простое химическое лигирование также основывается на С-концевых цистеиновых остатках (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96). В европейском патенте EP 1074563 описывается метод конъюгирования, который основывается на более быстрой реакции цистеина в пределах отрезка из отрицательно заряженных аминокислот с цистеином, расположенным в отрезке из положительно заряженных аминокислот.

Фрагмент также может представлять собой синтетический пептид или пептидомиметик. В случае, если полипептид является химически синтезированным, аминокислоты с нетипичной химической реакционной способностью могут быть включены в ходе синтеза (см., например, de Graaf, A.J. et al., *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Поскольку речь идет о широком спектре нетипичных функциональных групп, и их можно ввести в синтетический пептид, конъюгирование такого пептида с линкером является стандартной химической процедурой.

Для получения меченого одной меткой полипептида конъюгат со стехиометрическим соотношением 1:1 можно отделить от других побочных продуктов с помощью хроматографии. Эту процедуру может облегчить использование меченого красителем связывающего элемента в составе пары и заряженного линкера. При использовании данного вида меченого и имеющего сильный отрицательный заряд связывающего элемента в составе пары конъюгированные с одной меткой полипептиды легко отделяются от немеченых полипептидов и полипептидов, которые несут более чем один линкер, поскольку различие в заряде и молекулярном весе можно использовать для разделения. Флуоресцентный краситель может быть полезен для очистки комплекса от несвязавшихся компонентов, таких как меченый моновалентный связывающий элемент.

В соответствии с одним вариантом осуществления фрагмент, прикрепленный к антителу к GITR, выбран из группы, состоящей из связывающего фрагмента, метящего фрагмента и биологически активного фрагмента.

Антитела, описанные в настоящем документе, также можно конъюгировать с терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Подходящие терапевтические средства включают в себя антиметаболиты, алкилирующие средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ДНК-интеркаляторы, ДНК-сшивающие средства, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасомы, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимиотические средства. В ADC антитело и терапевтическое средство предпочтительно конъюгированы посредством расщепляемого линкера, такого как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Более предпочтительно линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 219), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC можно получать, как описано в патентах США №№ 7087600; 6989452 и 7129261; PCT публикациях международных заявок WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; публикациях заявок на патент США 20060024317; 20060004081 и 20060247295; раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Антитела к GITR, например, описанные в настоящем документе, также можно применять для выявления GITR, такого как человеческий GITR, например человеческого GITR в тканях или образцах ткани. Антитела можно применять, например, в анализе методом ELISA или в проточной цитометрии. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR приводят в контакт с клетками, например клетками в ткани, в течение периода времени, подходящего для того, чтобы произошло специфичное связывание, а затем добавляют реактив, например антитело, которое выявляет антитело к GITR. Иллюстративные анализы представлены в разделе "Примеры". Антитело к GITR может представлять собой полностью человеческое антитело, или оно может представлять собой химерное антитело, такое как антитело, имеющее человеческие вариабельные участки и мышиные константные участки или их части. Иллюстративные способы выявления GITR, например человеческого GITR, в образце (образце клеток или ткани) предусматривают: (1) приведение образца в контакт с антителом к GITR в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности специфичного связывания антитела к GITR с GITR в образце, и (2) приведение образца в контакт с выявляющим реактивом, например антителом, которое специфично связывается с антителом к GITR, как, например, с Fc-участком антитела к GITR, с выявлением таким образом GITR, связанного антителом к GITR. Можно включить этапы промывания после инкубирования с антителом и/или выявляющим реактивом. Антитела к GITR для применения в этих способах не обязаны быть связанными с меткой или выявляющими средствами, поскольку можно применять отдельное выявляющее средство.

Другие применения антител к GITR, например, в качестве средств для монотерапии или комплексной терапии представлены в других местах в настоящем документе, например в разделе, относящемся к методам комплексного лечения.

#### XIV. Биспецифичные молекулы.

Антитела, описанные в настоящем документе, можно применять для образования биспецифичных молекул. Из антитела к GITR или его антигенсвязывающих частей можно получить производные или их можно связать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора), с образованием биспецифичной молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Например, антитело к GITR может быть связано с антителом или scFv, специфично связывающимися с любым белком, который можно применять в качестве потенциальных мишеней для методов комплексного лечения, таким как белки, описанные в настоящем документе (например, антитела к PD-1, PD-L1 или LAG-3). В действительности, описанное в настоящем документе антитело можно дериватизировать или связать более чем с одной другой функциональной молекулой с образованием мультиспецифичных молекул, которые связываются с более чем двумя разными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; также предполагается, что такие мультиспецифичные молекулы охватываются термином "биспецифичная молекула", используемым в настоящем документе. Для создания биспецифичной молекулы, описанной в настоящем документе, можно обеспечить функциональную связь (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) антитела, описанного в настоящем документе, с одной или несколькими другими связывающимися молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, таким образом, чтобы в результате образовалась биспецифичная молекула.

Соответственно в настоящем документе предполагаются биспецифичные молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую составляющую со специфичностью связывания в отношении GITR и вторую составляющую со специфичностью связывания в отношении второго эпитопа-мишени. В соответствии с вариантом осуществления, описанным в настоящем документе, в котором биспецифичная молекула яв-

ляется мультиспецифичной, молекула может дополнительно включать третью составляющую со специфичностью связывания.

В соответствии с одним вариантом осуществления биспецифичные молекулы, описанные в настоящем документе, содержат в качестве составляющей со специфичностью связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент такого антитела, в том числе, например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv (scFv). Антитело может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечный конструктор, который описан Ladner и соавт. в патенте США № 4946778, содержание которого специально включено посредством ссылки.

Хотя предпочтительными являются человеческие моноклональные антитела, другие антитела, которые можно использовать в биспецифичных молекулах, описанных в настоящем документе, представляют собой мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифичные молекулы, описанные в настоящем документе, можно получить путем конъюгирования составляющих со специфичностями связывания с использованием способов, известных в уровне техники. Например, каждую составляющую со специфичностью связывания в биспецифичной молекуле можно получить отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Если составляющими со специфичностями связывания являются белки или пептиды, ряд связывающих или сшивающих средств можно использовать для ковалентного конъюгирования. Примеры сшивающих средств включают в себя белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al. (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, M.A. et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие методы включают в себя 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). Предпочтительными конъюгирующими средствами являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс).

Если составляющими со специфичностями связывания являются антитела, их можно конъюгировать посредством образования сульфгидрильной связи между С-концевыми шарнирными участками двух тяжелых цепей. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления шарнирный участок модифицирован таким образом, чтобы перед конъюгированием он содержал нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно один.

В качестве альтернативы обе составляющие со специфичностями связывания могут быть закодированы в том же векторе, и их экспрессия и сборка может осуществляться в одной той же клетке-хозяине. Этот способ является особенно полезным в случае, когда биспецифичная молекула представляет собой слитый белок mAb × mAb, mAb × Fab, mAb × (scFv)<sub>2</sub>, Fab × F(ab')<sub>2</sub> или лиганд × Fab. Биспецифичное антитело может содержать антитело, содержащее scFv на С-конце каждой тяжелой цепи. Биспецифичная молекула, описанная в настоящем документе, может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифичную молекулу, содержащую две связывающие детерминанты. Биспецифичные молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифичных молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5 455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США № 5258498 и патенте США № 5482858.

Связывание биспецифичных молекул с их специфическими мишенями можно подтвердить с использованием методов, принятых в данной области техники, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), анализ методом FACS, биологический анализ (например, ингибирование роста) или вестерн-блоттинг анализ. В каждом из этих анализов обычно выявляют наличие комплексов белок-антитело, представляющих интерес в данном случае, при использовании меченого реактива (например, антитела), специфичного в отношении комплекса, представляющего интерес.

#### XV. Композиции.

Также предполагаются композиции, например фармацевтические композиции, содержащие одно антитело к GITR, или комбинацию антител к GITR, или комбинацию с антителами к другим мишеням, или их антигенсвязывающую часть(части), описанные в настоящем документе, составленные вместе фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать в себя одно антитело, или иммуноконъюгат, или биспецифичную молекулу, описанные в настоящем документе, или комбинацию (например, двух или более различных) антител, или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул, описанных в настоящем документе. Например, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов или биспецифичных молекул), которые связываются с разными эпитопами на антигене-мишени или которые характеризуются взаимодополняющими активностями.

В соответствии с определенными вариантами осуществления композиция содержит антитело к GITR в концентрации, составляющей по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 1-300 или 100-300

мг/мл.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также можно вводить в рамках комплексной терапии, т.е. комбинировать с другими средствами. Например, комплексная терапия может включать в себя антитело к GITR, описанной в настоящем документе, комбинируемое по меньшей мере с одним другим противораковым средством и/или средством, стимулирующим (например, активирующим) Т-клетки. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комплексной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном применениям антител, описанных в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, могут включать другие соединения, лекарственные средства и/или средства, применяемые для лечения злокачественной опухоли. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать в себя, например, химиотерапевтические лекарственные средства, лекарственные средства на основе малых молекул или антитела, которые стимулируют иммунную реакцию в отношении заданной злокачественной опухоли. В некоторых случаях терапевтические композиции могут включать в себя, например, одно или несколько из антитела к CTLA-4, антитела к PD-1, антитела к PDL-1, антитела к OX40 (также известен как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L), антитела к CD137 или антитела к LAG-3.

Как используется в настоящем документе, "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотоничные средства и средства, задерживающие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифичную молекулу можно обеспечить покрытием из материала для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в настоящем документе, могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не придает каких-либо нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают в себя соли, полученные с нетоксичными неорганическими кислотами, такими как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также с нетоксичными органическими кислотами, такими как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения основания включают в себя соли, полученные с щелочными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглукзамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, также может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п. и (3) средства, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные эфиры органических кислот, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может обеспечиваться как за счет процедур стерилизации ранее, так и за счет включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотоничных средств, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть обусловлена включением средств, которые задерживают абсорб-

цию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии непосредственно перед приемом. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных субстратов известно в уровне техники. За исключением тех случаев, когда любая общепринятая среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предлагается их применение в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе. Фармацевтическая композиция может содержать консервант или может быть свободна от консерванта. В композиции могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными при условиях производства и хранения. Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотоничных средств, например сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обусловлена включением в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно приготовить путем включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним из вышеперечисленных ингредиентов или их комбинацией, если это необходимо, с последующей стерилизацией с помощью микрофильтрации. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных в настоящем документе. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента, а также любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизации и фильтрованию.

Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, будет изменяться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, обычно будет являться таким количеством композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. В целом, из общего количества в виде 100% это количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить одну разовую дозу, несколько разделенных доз можно вводить в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать, на что указывают потребности терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в единичной лекарственной форме для упрощения введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, используемая в настоящем документе, относится к физически раздельным единицам, подходящих в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; причем каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для обеспечения желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования в отношении единичных лекарственных форм, описанных в настоящем документе, диктуются (а) индивидуальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, который необходимо достичь, и (б) ограничениями в области получения составов, характерными для получения составов с таким активным соединением из соображений чувствительности у индивидов, и напрямую зависят от них.

В случае введения антитела доза находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и, как правило, от 0,01 до 5 или 10 мг/кг массы тела пациента. Например, дозы могут составлять 0,3, 1, 3, 5 или 10 мг/кг массы тела или в пределах диапазона 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема дозирования предусматривает введение раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в три месяца или раз в три-шесть месяцев. Предпочтительные схемы дозирования для антитела к GITR, описанного в настоящем документе, включают в себя 1 или 3 мг/кг массы тела посредством внутривенного введения, причем антитело дают с использованием одного из следующих режимов дозирования: (i) каждые четыре недели в ходе введения первых шести доз, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) в дозе 3 мг/кг массы тела однократно с последующим введением в дозе 1 мг/кг массы

тела каждые три недели.

Антитело к GITR можно вводить в постоянной дозе (схема дозирования с постоянной дозой).

В соответствии с некоторыми способами два или более моноклональных антител с разными специфичностями связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Антитело обычно вводят несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут быть, например, недельными, месячными, трехмесячными или годовыми. Интервалы также могут быть неодинаковыми, на что указывает измерение уровней антитела к антигену-мишени в крови пациента. В соответствии с некоторыми способами дозу корректируют для достижения концентрации антитела в плазме, составляющей приблизительно 1-1000 мкг/мл и в соответствии с некоторыми способами приблизительно 25-300 мкг/мл.

Антитело к GITR можно вводить с другим антителом по схеме дозирования другого антитела. Например, антитело к GITR можно вводить с антителом к PD-1, таким как ниволумаб (OPDIVO), каждые две недели в виде внутривенной инфузии за 60 мин до тех пор, пока происходит развитие заболевания, или пока не будет иметь место неприемлемая токсичность. Антитело к GITR можно вводить с пембролизумабом (KEYTRUDA) каждые 3 недели в виде внутривенной инфузии за 30 мин до тех пор, пока происходит развитие заболевания, или пока не будет иметь место неприемлемая токсичность.

Антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, причем в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота изменяются в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. Обычно наибольший период полувыведения проявляют человеческие антитела, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, не являющиеся человеческими. Дозировка и частота введения могут изменяться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях относительно низкую дозу вводят с относительно длинными интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. При терапевтических применениях относительно высокая доза с относительно короткими интервалами иногда требуются до тех пор, пока развитие заболевания ограничится или прекратится, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не проявится частичное или полное ослабление симптомов заболевания. После этого, введение пациенту можно осуществлять по профилактической схеме.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, можно изменять с тем, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, при этом не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе от активности конкретных используемых композиций, описанных в настоящем документе, или их сложной, солевой или амидной формы, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, получающего лечение, и подобных факторов, известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" антитела к GITR, описанного в настоящем документе, предпочтительно приводит в результате к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием. В случае злокачественной опухоли терапевтически эффективная доза предпочтительно приводит в результате к повышенной выживаемости и/или предупреждению дальнейшего ухудшения физических симптомов, связанных со злокачественной опухолью. Симптомы поражения злокачественной опухолью являются широко известными в уровне техники и включают, например, необычные признаки родинки, изменение внешнего вида родинки, в том числе асимметрии, границ, цвета и/или диаметра, новообразованная пигментированная область кожи, ненормальную родинку, затемненную область под ногтем, уплотнения в молочной железе, изменения соска, кисты в молочной железе, боль в молочной железе, смерть, потерю массы, слабость, переутомление, затруднения с приемом пищи, потерю аппетита, хронический кашель, ухудшенную одышку, харканье кровью, кровь в моче, кровь в кале, тошноту, рвоту, печеночные метастазы, легочные метастазы, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, вздутие, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, констипацию, вздутие живота, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, рвота с кровью, сильное потоотделение, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, разлитие желчи, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстую кишку, легочные метастазы, метастазы в мочевой пузырь, печеночные метастазы, метастазы в кости, почечные метастазы и метастазы в поджелудочную железу, затрудненное глотание и т.п.

Терапевтически эффективная доза может предупредить или замедлить появление злокачественной опухоли, что может быть желательным, когда присутствуют ранние или предварительные признаки заболевания. Лабораторные анализы, используемые в диагностике злокачественных опухолей, включают в себя химические анализы (в том числе измерение уровней GITR), гематологические, серологические и

радиологические анализы. Соответственно любой клинический или биохимический анализ, с помощью которого отслеживается любой из вышеизложенных показателей, можно использовать для определения того, присутствует ли конкретное лечебное средство в терапевтически эффективной дозе для лечения злокачественной опухоли. Специалист в данной области техники будет способен определить такие количества, исходя из таких факторов, как размеры субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретные выбранные композиция или путь введения.

Композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из ряда способов, известных в уровне техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для антител, описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриаартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутривнутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию.

В качестве альтернативы описанное в настоящем документе антитело можно вводить посредством не-парентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно приготовить с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, как, например, состав с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов защищены патентами или являются общеизвестными специалистам в данной области техники; см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с использованием медицинских устройств, известных в уровне техники. Например, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления терапевтическую композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить с использованием безыгольного устройства для подкожной инъекции, такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры широко известных имплантатов и модулей для применения с антителами к GITR, описанными в настоящем документе, включают в себя: патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный микронасос для дозирования лекарственного препарата с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных препаратов через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для лекарственного препарата для доставки лекарственного препарата с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный аппарат, обеспечивающий переменную скорость течения жидкости для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства с многокамерными отсеками; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в данный документ посредством ссылки. Специалистам в данной области техники известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR, описанные в настоящем документе, могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить надлежащее распространение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (БВВ) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения терапевтическими соединениями, описанными в настоящем документе, БВВ (если это желательно, например, в случае злокачественных опухолей головного мозга) их можно составить, например, в липосомах. По поводу способов получения липосом, см., например, патенты США №№ 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в конкретные клетки или органы, тем самым повышая целенаправленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 за авторством Low и соавт.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

## XVI. Применения и способы.

Антитела, композиции антител и способы, описанные в настоящем документе, имеют многочисленные применения *in vitro* и *in vivo*, включающие, например, усиление иммунной реакции посредством активации передачи сигнала с помощью GITR или выявление GITR. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой человеческие антитела. Например, антитела к GITR, описанные в настоящем документе, можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при ряде заболеваний. Соответственно в настоящем документе предполагаются способы модификации иммунной реакции у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем документе, таким образом, чтобы иммунная реакция у субъекта была модифицирована. Предпочтительно реакцию усиливают, стимулируют или повышают.

Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, у которых было бы желательно усиление иммунной реакции. Способы являются особенно подходящими для лечения пациентов-людей с нарушениями, лечение которых можно осуществлять путем усиления иммунной реакции (например, опосредованной Т-клетками иммунной реакции, например антигенспецифичной Т-клеточной реакции). В соответствии с конкретным вариантом осуществления способы являются особенно подходящими для лечения злокачественной опухоли *in vivo*. Для достижения антигенспецифичного усиления иммунитета антитела к GITR, описанные в настоящем документе, можно вводить вместе с антигеном, представляющим интерес, или антиген может уже присутствовать у субъекта, подлежащего лечению (например, субъекта-носителя опухоли или субъекта-носителя вируса). Если антитела к GITR вводят вместе с другим средством, их можно вводить раздельно или одновременно.

Также охватываются способы выявления наличия антигена человеческого GITR в образце или измерения количества антигена человеческого GITR, предусматривающие приведение образца и контрольного образца в контакт с моноклональным антителом, например с человеческим моноклональным антителом, или его антигенсвязывающей частью, которые специфично связываются с человеческим GITR, в условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом или его частью и человеческим GITR. Затем выявляют образование комплекса, причем различие в образовании комплекса между образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на наличие антигена человеческого GITR в образце. Более того, антитела к GITR, описанные в настоящем документе, можно применять для очистки человеческого GITR посредством иммуноаффинной очистки.

При условии способности антител к GITR, описанных в настоящем документе, к стимуляции или костимуляции Т-клеточных реакций, например антигенспецифичных Т-клеточных реакций, в настоящем документе предполагаются способы *in vitro* и *in vivo* применения антител, описанных в настоящем документе, для стимуляции, усиления или повышения антигенспецифичных Т-клеточных реакций, например противоопухолевых Т-клеточных реакций. В соответствии с определенными вариантами осуществления также предлагается стимуляция CD3 (например, посредством совместного инкубирования с клеткой, экспрессирующей мембранный CD3), причем данную стимуляцию можно обеспечить одновременно со стимуляцией антителом к GITR, до или после нее. Например, в настоящем документе предполагаются способы стимуляции антигенспецифичной Т-клеточной реакции, предусматривающие приведение указанной Т-клетки в контакт с антителом к GITR, описанным в настоящем документе, и необязательно с антителом к CD3 таким образом, чтобы стимулировалась антигенспецифичная Т-клеточная реакция. Для измерения антигенспецифичной Т-клеточной реакции можно использовать любой подходящий параметр, указывающий на антигенспецифичную Т-клеточную реакцию. Неограничивающие примеры таких подходящих указывающих параметров включают в себя повышенную пролиферацию Т-клеток в присутствии антитела и/или повышенную продукцию цитокинов в присутствии антитела. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления стимулируется продукция антигенспецифичной Т-клеткой интерлейкина-2 и/или интерферона- $\gamma$ .

Т-клетки, которые могут активироваться или костимулироваться антителами к GITR, включают в себя CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Т-клетки могут представлять собой T<sub>eff</sub> клетки, например CD4<sup>+</sup> T<sub>eff</sub> клетки, CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub> клетки, хелперные Т-клетки (T<sub>h</sub>) и цитотоксические Т-клетки (T<sub>c</sub>).

Также охватываются способы стимуляции иммунной реакции (например, антигенспецифичной Т-клеточной реакции) у субъекта, предусматривающие введение антитела к GITR, описанного в настоящем документе, субъекту таким образом, чтобы у субъекта стимулировалась иммунная реакция (например, антигенспецифичная Т-клеточная реакция). В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления субъект является субъектом-носителем опухоли, а стимулируется иммунная реакция в отношении опухоли. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или опухолевые заболевания кроветворной и лимфоидной ткани, например гематологическую злокачественную опухоль. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль является неиммуногенной. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль является положительной по PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль является отрицательной по PD-L1. Субъект также может являться субъектом-носителем вируса, и стимулируется иммунная реакция в отношении

вируса.

Дополнительно предполагаются способы ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела к GITR, описанного в настоящем документе, таким образом, чтобы ингибировался рост опухоли у субъекта. Также предполагаются способы лечения вирусной инфекции у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела к GITR, описанного в настоящем документе, таким образом, чтобы осуществлялось лечение вирусной инфекции у субъекта.

В настоящем документе также охватываются способы сокращения количества  $T_{reg}$  клеток в опухолевом микроокружении у субъекта, имеющего опухоль, например злокачественную опухоль, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к GITR, описанного в настоящем документе, которое содержит Fc, стимулирующий сокращение количества  $T_{reg}$  клеток в опухолевом микроокружении. Fc, например, может представлять собой Fc с эффекторной функцией или усиленной эффекторной функцией, такой как связывание или наличие усиленного связывания с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления сокращение количества  $T_{reg}$  происходит без значительного сокращения количества или ингибирования  $T_{eff}$  в опухолевом микроокружении и без значительного сокращения количества или ингибирования  $T_{eff}$  клеток и  $T_{reg}$  клеток за пределами опухолевого микроокружения, например на периферии. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект характеризуется более высокими уровнями GITR на  $T_{reg}$  клетках, чем на  $T_{eff}$  клетках, например, в опухолевом микроокружении.

В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект получает лечение антителом к GITR, имеющим Fc, который усиливает агонизм, например связывается с ингибирующим FcRIIb или характеризуется усиленным связыванием с ним. Определенные виды лечения осуществляют с использованием антитела к GITR, имеющего Fc, который не связывается с одним или несколькими активирующими FcR, или характеризуется пониженным связыванием с ними. Антитела к GITR могут сокращать количество  $T_{reg}$  в опухолях и/или количество  $T_{reg}$  среди опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR дают субъекту в качестве вспомогательной терапии. Методы лечения субъектов, имеющих злокачественную опухоль, с использованием антитела к GITR могут приводить к длительному выживанию, например к долгосрочной устойчивой реакции в сравнении с современным стандартом лечения; долгосрочному выживанию в течение по меньшей мере 3, 6, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет или безрецидивному выживанию в течение по меньшей мере 3, 6, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет. В соответствии с определенными вариантами осуществления лечение субъекта, имеющего злокачественную опухоль, с использованием антитела к GITR предупреждает рецидив злокачественной опухоли или задерживает рецидив злокачественной опухоли, например на 3, 6, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет. Лечение антителом к GITR можно применять в качестве терапии первой, второй или третьей линии.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления антитело к GITR, описанное в настоящем документе, не является значительно токсичным. Например, антитело к GITR не является значительно токсичным в отношении органа человека, например одного или нескольких из печени, почки, головного мозга, легких и сердца, что определено, например, в клинических испытаниях. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR не запускает в значительно нежелательную иммунную реакцию, например аутоиммунную реакцию или воспаление.

В соответствии с определенными вариантами осуществления лечение субъекта агонистом антитела к GITR (например, антителом к GITR) не приводит в результате к избыточной стимуляции иммунной системы в такой степени, чтобы иммунная система субъекта затем атаковала самого субъекта (например, аутоиммунная реакция) или приводила в результате, например, к анафилаксии. Следовательно, антитела к GITR предпочтительно не вызывают анафилаксию.

В соответствии с определенными вариантами осуществления лечение субъекта с использованием антитела к GITR, описанного в настоящем документе, например антитела, содержащего CDR или переменные участки 28F3, не вызывает значительных воспалительных реакций, например иммуно-обусловленной пневмонии, иммуно-обусловленного колита, иммуно-обусловленного гепатита, иммуно-обусловленного нефрита или почечной дисфункции, иммуно-обусловленного гипопизита, иммуно-обусловленной гипотиреоза и гипертиреоза или других иммуно-обусловленных неблагоприятных реакций. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR, содержащее CDR или переменные участки 28F3, вызывает меньше воспалительных реакций, например, например иммуно-обусловленной пневмонии, иммуно-обусловленного колита, иммуно-обусловленного гепатита, иммуно-обусловленного нефрита или почечной дисфункции, иммуно-обусловленного гипопизита, иммуно-обусловленной гипотиреоза и гипертиреоза, анафилаксии или других иммуно-обусловленных неблагоприятных реакций, чем другие антитела к GITR. Другие иммуно-обусловленные неблагоприятные реакции включают в себя: расстройства сердечной деятельности, например желудочковую аритмию; глазные нарушения, например иридоциклит; инфузионные реакции; повышенная активность амилазы, повышенная активность липазы; расстройства нервной системы, например головокружение, периферическую и сенсорную невропатию; кожные нарушения и нарушения подкожной ткани, например сыпь, зуд, шелушащийся дерматит, многоформную эритему, витилиго или псориаз; респираторные, грудные и медиа-

стиральные нарушения, например кашель; усталость; тошноту; пониженный аппетит; констипацию; артралгию и диарею.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR обеспечивает синергичные противоопухолевые эффекты в комбинации с другим средством для терапии злокачественной опухоли, таким как соединение, которое стимулирует иммунную систему (например, иммуноонкологическое средство), например соединение, описанное в настоящем документе, или соединение, модулирующее мишень, описанную в настоящем документе.

Эти и другие способы, описанные в настоящем документе, более подробно обсуждаются ниже.

**Злокачественная опухоль.**

Активация GITR антителами к GITR может усиливать иммунную реакцию в отношении клеток злокачественной опухоли у пациента. В настоящем документе предполагаются способы лечения субъекта, имеющего злокачественную опухоль, предусматривающие введение субъекту антитела к GITR, описанного в настоящем документе, таким образом, чтобы осуществлялось лечение субъекта, например, чтобы рост злокачественных опухолей ингибировался или замедлялся, и/или чтобы достигалась регрессия опухолей и/или длительное выживание. Антитело к GITR можно применять само по себе для ингибирования роста злокачественных опухолей. В качестве альтернативы антитело к GITR можно применять в сочетании с другим средством, например другим иммуногенным средством, стандартным средством для лечения злокачественной опухоли или другим антителом, как описано ниже.

Соответственно в настоящем документе предполагаются способы лечения злокачественной опухоли, например, посредством ингибирования роста опухолевых клеток, у субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к GITR, описанного в настоящем документе, например 28F3.IgG1 или 28F3.IgG1.1, или его антигенсвязывающей части. Антитело может представлять собой человеческое антитело к GITR (такое как любое из человеческих антител к GITR человека, описанных в настоящем документе). В качестве дополнения или альтернативы, антитело может представлять собой химерное или гуманизованное антитело к GITR, например химерное или гуманизованное антитело к GITR, содержащее последовательности 28F3 или других антител к GITR, описанных в настоящем документе.

Злокачественные опухоли, чей рост можно ингибировать с помощью антител согласно настоящему изобретению, включают в себя злокачественные опухоли, которые, как правило, восприимчивы к иммунотерапии, и злокачественные опухоли, как правило, невосприимчивые к иммунотерапии. Злокачественные опухоли могут представлять собой солидные злокачественные опухоли или гематологические злокачественные опухоли (опухолевые заболевания кроветворной и лимфоидной ткани). Неограничивающие примеры злокачественных опухолей для лечения включают в себя плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, ороговевающий немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неороговевающий NSCLC, глиому, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль почки (например, светлоклеточную карциному), злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, злокачественную опухоль эндометрия, злокачественную опухоль почки (например, почечноклеточную карциному (RCC)), злокачественную опухоль предстательной железы (например, гормонорезистентную аденокарциному предстательной железы), злокачественную опухоль щитовидной железы, нейробластому, злокачественную опухоль поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль мочевого пузыря, гепатому, злокачественную опухоль молочной железы, карциному толстой кишки и злокачественную опухоль (или карциному) головы и шеи, злокачественную опухоль желудка, герминогенную злокачественную опухоль, детскую саркому, синозальную злокачественную опухоль из клеток натуральных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как злокачественная меланома кожи или внутриглазная злокачественная меланома), злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль заднепроходной области, злокачественную опухоль яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкого кишечника, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль парашитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, солидные опухоли детского возраста, злокачественную опухоль мочеточника, карциному почечной лоханки, злокачественное новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, злокачественную опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, злокачественные опухоли, вызванные факторами окружающей среды, в том числе вызванные асбестом злокачественные опухоли, злокачественные опухоли, связанные с вирусом, или злокачественные опухоли вирусного происхождения (например, вирус папилломы человека (связанные с HPV или происходящие из HPV опухоли)) и гематологические злокачественные опухоли, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови,

т.е. миелоидной клеточной линии (которая дает гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидной клеточной линии (которая дает В, Т, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфолейкоз (CLL) и хронический миелолейкоз (CML), недифференцированный AML (МО), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), выделенная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточную гематологическую злокачественную опухоль, например В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмоцитозидную лимфому, моноцитозидную В-клеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), анапластическую (например, Ki 1+) крупноклеточную лимфому, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, лимфому из клеток мантлийной зоны, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, лимфангиому, Т-клеточную лимфому тонкой кишки, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, Т-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, Т-лимфобластную лимфому/ Т-лимфобластный лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическую Т-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, истинную гистиоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную выпотную лимфому, В-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому (LBL), гемобласты из лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому из клеток предшественников, кожную Т-клеточную лимфому (CTLC) (также называемую микозом грибовидным или синдром Сезари) и лимфоплазмацитоидную лимфому (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как IgG-миелома, миелома легких цепей, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая вялотекущая миелома), единичная плазмочитома и множественные миеломы, хронический лимфолейкоз (CLL), волосатоклеточную лимфому; гемобласты из клеток миелоидной линии, опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, в том числе астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; а также другие опухоли, в том числе меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярную злокачественную опухоль щитовидной железы и тератокарциному, гемобласты из клеток лимфоидной линии, например Т-клеточные и В-клеточные опухоли, в том числе без ограничения Т-клеточные нарушения, такие как Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), в том числе мелкоклеточного и мозговидного типа; лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (LGL), преимущественно Т-клеточного типа; a/d T-NHL печеночно-селезеночную лимфому; периферическую Т-клеточную лимфому/ Т-клеточную лимфому из клеток, вышедших за пределы тимуса (плеоморфный и иммунобластный подтипы); Т-клеточную лимфангиому (назальную); злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль шеи, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных злокачественных опухолей. Способы, описанные в настоящем документе, также можно применять для лечения метастазирующих злокачественных опухолей, нерезектабельных и/или невосприимчивых к лечению злокачественных опухолей (например, злокачественных опухолей, невосприимчивых к проводимой ранее иммунотерапии, например, с использованием блокирующего антитела к CTLA-4 или к PD-1 антителу) и рецидивирующих злокачественных опухолей.

В соответствии с определенными вариантами осуществления Ab к GITR вводят пациентам, имеющим злокачественную опухоль, которая проявляет недостаточную восприимчивость к предшествующему лечению, например предшествующему лечению иммуноонкологическим лекарственным средством, или пациентам, имеющим злокачественную опухоль, которая является невосприимчивой или устойчивой, либо невосприимчивой или устойчивой по своей природе (например, невосприимчивой к антагонисту PD-1 пути), либо которой приобретено устойчивое или невосприимчивое состояние. Например, субъекты, которые являются невосприимчивыми или недостаточно восприимчивыми к первой терапии, или у которых наблюдается развитие заболевания после лечения, например лечения антителом к PD-1, могут получать лечение посредством введения антитела к GITR самого по себе или в комбинации с другой терапией (например, с терапией антителом к PD-1).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR вводят пациентам, которые ранее не получали иммуноонкологическое средство (т.е. не проходили лечение им), например антагонист PD-1 пути.

Антитело к GITR можно назначать со стандартным лечением. Антитело к GITR можно назначать в качестве поддерживающей терапии, например терапии, которая предназначена для предупреждения появления или рецидива опухолей.

Антитело к GITR можно назначать с другим лечением, например радиационным облучением, хи-

рургическим вмешательством или химиотерапией. Например, вспомогательную терапию антителом к GITR могут назначать, если существует риск, что могут присутствовать микрометастазы, и/или с целью снижения риска рецидива.

Антитело к GITR можно назначать в качестве монотерапии или только в качестве иммуностимулирующей терапии. Антитела к GITR, например антитела к GITR, описанные в настоящем документе, также можно комбинировать с иммуногенным средством, таким как клетки злокачественных опухолей, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать, включают в себя пептиды из антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно обсуждаются ниже).

Было показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, как, например, меланомы. Снижая порог активации Т-клеток посредством активации GITR, можно активировать реакцию на опухоль у хозяина, что обеспечивает возможность лечения неиммуногенных опухолей или опухолей с ограниченной иммуногенностью.

Антитело к GITR, например антитело к GITR, описанное в настоящем документе, можно сочетать с протоколом вакцинации. Было разработано много экспериментальных стратегий по вакцинации (см. Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, p. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition). В соответствии с одной из этих стратегий вакцину получают с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины являются наиболее эффективными, когда опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии GM-CSF. GM-CSF, как было показано, является сильным активатором презентирования антигенов при противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

Изучение экспрессии генов и паттернов экспрессии большого количества генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифичных антигенов (Rosenberg, S.A. (1999) *Immunity* 10: 281-7). Во многих случаях эти опухолеспецифичные антигены представляют собой дифференцировочные антигены, экспрессирующиеся в опухолях и в клетке, из которой возникает опухоль, например меланоцитарные антигены gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что более важно, многие из этих антигенов, как было показано, являются мишенями опухолеспецифичных Т-клеток, обнаруживаемых у хозяина. Активацию GITR можно использовать в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессирующихся в опухоли, для того, чтобы вызвать иммунную реакцию на эти белки. Эти белки в норме воспринимаются иммунной системой как аутоантигены, и, следовательно, она проявляет к ним толерантность. Опухолевый антиген может включать белок теломеразы, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% злокачественных опухолей человека и лишь в ограниченном количестве соматических тканей (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). Опухолевый антиген также может представлять собой "неоантигены", экспрессирующиеся в клетках злокачественной опухоли вследствие соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки из двух неродственных последовательностей (т.е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать в себя белки из вирусов, связанных со злокачественными опухолями человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифичного антигена, который можно использовать в сочетании с активацией GITR являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP являются высокоэффективными при доставке к антигенпрезентирующим клеткам для того, чтобы вызвать иммунитет к опухоли (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) являются высокоактивными антигенпрезентирующими клетками, которые можно использовать для примирения с целью вызвать антигенспецифичные реакции. DC можно получать *ex vivo* и нагружать различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC также можно трансдуцировать с использованием генетических средств для экспрессии этих опухолевых антигенов. Также можно осуществлять непосредственное слияние DC с опухолевыми клетками с целью иммунизации (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве метода вакцинации иммунизацию DC можно эффективно комбинировать с активацией GITR для того, чтобы активировать более сильные противоопухолевые реакции.

Активацию GITR также можно комбинировать со стандартными методами лечения злокачественной опухоли (например, хирургическим вмешательством, радиационным облучением и химиотерапией). Активацию GITR эффективно комбинировать со схемами химиотерапии. В некоторых случаях представ-

ляется возможным снижением дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является антитело к GITR в комбинации с декрбазинном для лечения меланомы. Другим примером таких комбинаций является антитело к GITR в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения активации GITR и химиотерапии является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить в результате к повышенным уровням опухолевого антигена в рамках пути презентирования антигена. Другими методами комплексной терапии, которые могут приводить в результате к синергии с активацией GITR вследствие гибели клеток, являются радиационное облучение, хирургическое вмешательство и выключение эндокринной функции. При каждом из этих протоколов создается источник опухолевого антигена у хозяина. Также с активацией GITR можно комбинировать ингибиторы ангиогенеза. Ингибирование ангиогенеза ведет к гибели опухолевых клеток, что может поставлять опухолевый антиген в пути презентирования антигена у хозяина.

Антитела к GITR, описанные в настоящем документе, также можно применять в комбинации с биспецифичными антителами, которые целенаправленно воздействуют на экспрессирующие Fc $\alpha$ - или Fc $\gamma$ -рецептор эффекторные клетки среди опухолевых клеток (см., например, патенты США № 5922845 и № 5837243). Биспецифичные антитела можно применять для целенаправленного воздействия на два отдельных антигена. Например, биспецифичные антитела к Fc-рецептору/опухолевому антигену (например, Her-2/neu) применялись для направления макрофагов к сайтам опухоли. Такое целенаправленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифичные реакции. Т-клеточное звено в этих реакциях будет дополняться активацией GITR. В качестве альтернативы антиген можно доставлять непосредственно в DC при использовании биспецифичных антител, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером клеточной поверхности, специфичным для дендритных клеток.

Опухоли ускользают от иммунологического надзора хозяина посредством обширного ряда механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммунодепрессивными. Они включают в себя, среди прочих, TGF- $\beta$  (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), и Fas лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждой из этих молекул можно применять в комбинации с антителами к GITR для противодействия эффектам иммунодепрессивного средства и поддержки иммунным реакциям против опухоли у хозяина.

Другие антитела, которые активируют иммунологическую реактивность у хозяина можно применять в комбинации с антителами к GITR. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентирование антигена. Антитела к CD40 способны эффективно заменять хелперную активность Т-клеток (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478), и их можно применять в сочетании с антителами к GITR. Активирующие антитела к костимулирующим молекулам для Т-клеток, таким как CTLA-4 (например, патент США № 5811097), OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток. Ингибиторы PD1 или PD-L1 также можно применять в сочетании с антителом к GITR.

В настоящее время трансплантацию костного мозга применяют для лечения ряда опухолей гемопатического происхождения. Несмотря на то что следствием этого лечения является реакция "трансплантат против хозяина", можно получить терапевтическую выгоду из реакций "трансплантат против опухоли". Активацию GITR можно применять для повышения эффективности пересаженных от донора опухолеспецифичных Т-клеток.

Также существует несколько экспериментальных лечебных протоколов, которые включают *ex vivo* активацию и разращивание антигенспецифичных Т-клеток, а также адоптивный перенос этих клеток реципиентам с целью стимуляции антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Эти способы также можно применять для активации Т-клеточных реакций в отношении инфекционных агентов, таких как CMV. *Ex vivo* активация в присутствии антител к GITR может повышать встречаемость и активность подвергнутых адоптивному переносу Т-клеток.

#### Инфекционные заболевания.

Способы, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения пациентов, которые подверглись действию конкретных токсинов или патогенов. Соответственно в соответствии с еще одним аспектом, описанным в настоящем документе, предлагается способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела к GITR или его антигенсвязывающей части таким образом, чтобы осуществлялось лечение инфекционного заболевания у субъекта. В качестве дополнения или альтернативы, антитело может представлять собой химерное или гуманизованное антитело.

Аналогично обсуждаемому выше применению в отношении опухолей опосредованную антителом активацию GITR можно применять саму по себе или в качестве адьюванта в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунной реакции в отношении патогенов, токсинов и аутоантигенов. Примеры патогенов

нов, в отношении которых данный терапевтический подход может быть особенно полезным, включают в себя патогены, против которых в настоящее время не существует эффективной вакцины, или патогены, против которых традиционные вакцины являются не вполне эффективными. Они включают в себя HIV (ВИЧ), гепатит (А, В и С), грипп, герпес, лямблию, малярию, лейшманию, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, но не ограничиваются ими. Активация GITR может быть полезной против инфекций, вызываемых агентами, такими как HIV, которые презентуют измененные антигены в ходе развития инфекций. Эти новые эпитопы распознаются как чужеродные во время введения антитела к человеческому GITR, тем самым вызывая сильную Т-клеточную реакцию.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают в себя HIV, гепатит (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус осповакцины, HTLV-вирус (Т-лимфотропный вирус человека), вирус денге, папилломавирус, вирус контактного моллюска, вирус полиомиелита, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают в себя хламидию, риккетсии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протей, серратию, синегнойную палочку, легионеллу, бактерию-возбудитель дифтерии, сальмонеллу, бациллы, бактерию-возбудитель холеры, бактерию-возбудитель столбняка, бактерию-возбудитель ботулизма, бактерию-возбудитель сибирской язвы, бактерию-возбудитель чумы, бактерию-возбудитель лептоспироза и бактерию-возбудитель болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают в себя *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), рода из семейства *Mucorales* (мукор, абсидия, ризопус), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают в себя *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех из вышеуказанных способов активацию GITR можно комбинировать с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2), или терапия биспецифичными антителами, которая обеспечивает усиленное презентирование опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

Аутоиммунные реакции.

Антитела к GITR могут вызывать и усиливать аутоиммунные реакции. В действительности, при индукции противоопухолевых реакций с использованием вакцин на основе опухолевых клеток и пептидов выявили, что многие противоопухолевые реакции включают реакции против собственных антигенов (van Elsas et al. (2001) J. Exp. Med. 194:481-489; Overwijk, et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000), выше; Rosenberg & White (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19 (1): 81-4). Таким образом, возможно рассматривать применение антител к GITR в сочетании с различными собственными белками организма с целью разработки протоколов вакцинации для того, чтобы эффективно вызывать иммунные реакции против этих собственных белков для лечения заболевания. Например, болезнь Альцгеймера вызывает неприемлемое накопление пептида Аβ в отложениях амилоида в головном мозге; гуморальные иммунные реакции против амилоида способны устранить эти отложения амилоида (Schenk et al., (1999) Nature 400: 173-177).

В качестве мишеней также можно использовать другие собственные белки организма, такие как IgE для лечения аллергии и астмы и TNFα для ревматоидного артрита. Наконец, при применении антител к GITR могут индуцироваться гуморальные иммунные реакции в отношении различных гормонов. Гуморальные иммунные реакции с выработкой нейтрализующих антител к половым гормонам можно применять для контрацепции. Гуморальную иммунную реакцию с выработкой нейтрализующих антител к гормонам и другим растворимым факторам, которые требуются для роста конкретных опухолей, также можно рассматривать как возможные мишени вакцинации.

Способы, аналогичные описанным выше, для применения антител к GITR можно применять для индукции терапевтических аутоиммунных реакций для лечения пациентов с неприемлемым накоплением других аутоантигенов, таких как накопления амилоида, в том числе накопления Аβ при болезни Альцгеймера, цитокинов, таких как TNFα и IgE.

#### Вакцины.

Антитела к GITR, описанные в настоящем документе, можно применять для стимуляции антиген-специфичных иммунных реакций посредством совместного введения антитела к GITR с антигеном, представляющим интерес (например, вакциной). Соответственно в настоящем документе предполагаются способы усиления иммунной реакции на антиген у субъекта, предусматривающие введение субъекту: (i) антигена и (ii) антитела к GITR или его антигенсвязывающей части таким образом, чтобы у субъекта усиливалась иммунная реакция на антиген. Антитело может представлять собой человеческое антитело к GITR (такое как любое из человеческих антител к GITR, описанных в настоящем документе). В качестве дополнения или альтернативы, антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают в себя антигены, обсуждавшиеся в разделах выше, такие как опухолевые антигены (или противоопухолевые вакцины), обсуждаемые выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

В соответствии с определенными вариантами осуществления пептид или слитый белок, содержащий эпитоп, с которым связывается антитело к GITR, применяют в качестве вакцины вместо антитела к GITR или в дополнение к нему.

Подходящие пути введения композиций антител (например, человеческих моноклональных антител, мультиспецифичных и биспецифичных молекул и иммуноконъюгатов), описанных в настоящем документе, *in vivo* и *in vitro* являются хорошо известными в уровне техники и могут быть выбраны специалистами в данной области техники. Например, композиции антител можно вводить с помощью инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозировки применяемых молекул будут зависеть от возраста и веса субъекта, а также от концентрации и/или составления композиции антитела.

Как описано ранее, антитела к GITR, описанные в настоящем документе, можно вводить совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например цитотоксическим средством, радиотоксическим средством или иммунодепрессивным средством. Антитело может быть связано со средством (в виде иммунного комплекса), или его можно вводить отдельно от средства. В последнем случае (отдельное введение) антитело можно вводить перед средством, после него или одновременно с ним или можно вводить совместно с другими известными методами терапии, например терапии злокачественных опухолей, например радиационного облучения. Такие терапевтические средства включают среди прочих противоопухолевые средства, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамид, гидроксимочевина, которые сами по себе эффективны только при уровнях, которые являются токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/мл один раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл раз в 21 день. Совместное введение антител к GITR или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, с химиотерапевтическими средствами обеспечивает два противораковых средства, которые действуют посредством разных механизмов, которые приводят к цитотоксическому эффекту в отношении человеческих опухолевых клеток. Такое совместное введение может решить проблемы, обусловленные развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенных свойств опухолевых клеток, которые придают им способность не реагировать с антителом.

Также в объеме описанного в настоящем документе находятся наборы, содержащие композиции антител, описанные в настоящем документе (например, человеческие антитела, биспецифичные или мультиспецифичные молекулы или иммуноконъюгаты) и инструкции к применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реактив или одно или несколько дополнительных человеческих антител, описанных в настоящем документе (например, человеческое антитело с дополняющей активностью, которое связывается с эпитопом на антигене GITR, отличным от первого человеческого антитела). Наборы, как правило, включают в себя этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого набора. Термин этикетка включает в себя любой письменный или записанный материал, поставляемый в наборе или с набором, или который иным образом сопутствует набору.

#### Методы комплексной терапии.

В дополнение к представленным выше методам комплексной терапии антитела к GITR, например, описанные в настоящем документе, также можно применять в комплексной терапии, например, для лечения злокачественной опухоли, как описано ниже.

В настоящем документе предполагаются способы комплексной терапии, при которых антитело к GITR вводят совместно с одним или несколькими дополнительными средствами, например лекарственными средствами на основе малых молекул, антителами или их антигенсвязывающими частями, которые являются эффективными при стимуляции иммунных реакций, таким образом дополнительно усиливая, стимулируя или повышая иммунные реакции у субъекта. Как показано в разделе "Примеры", введение агонистического антитела к GITR и антагонистического антитела к PD-1 мышам оказывает синергический эффект при ингибировании роста опухоли.

Обычно антитело к GITR, например, описанное в настоящем документе, можно комбинировать с: (i) агонистом стимулирующей (например, костимулирующей) молекулы (например, рецептором или лигандом) и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала или молекулы (например, рецептора или лиганда) на иммунных клетках, таких как Т-клетки, причем оба из этих вариантов приводят в результате к усиленным иммунным реакциям, таким как антигенспецифичные Т-клеточные реакции. В соответствии с определенными аспектами иммуноонкологическое средство представляет собой: (i) агонист стимулирующей (в том числе костимулирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) или (ii) антагонист ингибирующей (в том числе коингибирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) в клетках, задействованных в врожденном иммунитете, например в NK-клетках, и при этом иммуноонкологическое средство усиливает врожденный иммунитет. Такие иммуноонкологические средства часто называют регуляторами иммунологических контрольных точек, например ингибитором иммунологических контрольных точек или стимулятором иммунологических контрольных точек.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR вводят со средством, которое целенаправленно воздействует на стимулирующие или ингибирующие молекулы, являющиеся членами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Например, антитела к GITR, например, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту со средством, которое целенаправленно воздействует на члена семейства IgSF для повышения иммунной реакции. Например, антитело к GITR можно вводить со средством, которое целенаправленно воздействует (или специфически связывается) на член семейства B7 мембраносвязанных лигандов, который включает в себя B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6 или костимулирующий или коингибирующий рецептор, специфично связывающийся с членом семейства B7.

Антитело к GITR также можно вводить со средством, которое целенаправленно воздействует на член семейства молекул TNF и TNFR (лиганды или рецепторы), такой как CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT $\beta$ R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, лимфотоксин  $\alpha$ /TNF $\beta$ , TNFR2, TNF $\alpha$ , LT $\beta$ R, лимфотоксин  $\alpha$ 1 $\beta$ 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY и NGFR (см., например, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

Т-клеточные реакции можно стимулировать с помощью комбинации антител к GITR, описанных в настоящем документе, например 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1, и одного или нескольких из следующих средств:

(1) антагонист (ингибитор или блокирующее средство) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунологических контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, как описано выше, и один из следующих белков: TIM-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4; и/или

(2) агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Иллюстративные средства, которые модулируют один из вышеуказанных белков и которые можно комбинировать с агонистическими антителами к GITR, например, описанными в настоящем документе, для лечения злокачественной опухоли, включают в себя Yervoy<sup>TM</sup> (ипилилумаб) или тремелиумаб (для CTLA-4), галиксимаб (для B7.1), BMS-936558 (для PD-1), MK-3475 (для PD-1), AMP224 (для B7DC), BMS-936559 (для B7-H1), MPDL3280A (для B7-H1), MEDI-570 (для ICOS), AMG557 (для B7H2), MGA271 (для B7H3), IMP321 (для LAG-3), BMS-663513 (для CD137), PF-05082566 (для CD137), CDX-1127 (для CD27), антитело к OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (для OX40L), атацицепт (для TACI), CP-870893 (для CD40), лукатумумаб (для CD40), дацетузумаб (для CD40), муромонаб-CD3 (для CD3), ипилиумаб (для CTLA-4).

Антитела к GITR также можно вводить с пидилизумабом (CT-011), хотя его специфичность в отношении связывания PD-1 была поставлена под вопрос.

Другие молекулы, которые можно комбинировать с агонистическими антителами к GITR для лечения злокачественной опухоли, включают в себя антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, агонистические антитела к GITR можно комбинировать с антагонистами KIR (например, лирилуумабом).

Активация Т-клеток также регулируется растворимыми цитокинами, и антитела к GITR можно вводить субъекту, например, имеющему злокачественную опухоль, с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток, или агонистами цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к GITR можно применять в комбинации с: (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF, или семейства B7, или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF; "иммуно-

депрессивные цитокины"), и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток, для стимуляции иммунной реакции, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

Другие дополнительные средства для методов комплексной терапии включают в себя средства, которые ингибируют или сокращают количество макрофагов или моноцитов, в том числе без ограничения антагонисты CSF-1R, такие как антагонистические антитела к CSF-1R, в том числе RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Антитела к GITR также можно вводить со средствами, которые ингибируют передачу сигнала с помощью TGF- $\beta$ .

Дополнительные средства, которые можно комбинировать с антителом к GITR, включают в себя средства, которые усиливают презентирование опухолевых антигенов, например вакцины на основе дендритных клеток, секретирующие GM-CSF клеточные вакцины, CpG-олигонуклеотиды и имиквимод, или терапевтические средства, которые усиливают иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины).

Кроме того, другие терапевтические средства, которые можно комбинировать с антителом к GITR, включают в себя терапевтические средства, которые сокращают количество T<sub>reg</sub> клеток или блокируют их, например средство, которое специфично связывается с CD25.

Еще одним терапевтическим средством, которое можно комбинировать с антителом к GITR, является терапевтическое средство, которое ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота.

Другой класс средств, которые можно применять с антителом к GITR, включает в себя средства, которые ингибируют образование аденозина или ингибируют аденозиновый A2A-рецептор.

Другими терапевтическими средствами, которые можно комбинировать с антителом к GITR для лечения злокачественной опухоли, включают в себя терапевтические средства, которые обращают/предотвращают анергию или истощение Т-клеток, и терапевтические средства, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаления в сайте опухоли.

Антитело к GITR можно комбинировать более чем с одним иммуноонкологическим средством и, например, можно комбинировать с комбинаторным подходом, при котором целенаправленно воздействуют на многие элементы в пути развития иммунной реакции, как, например, одно или несколько из следующих: терапевтическое средство, которое усиливает презентирование опухолевых антигенов (например, вакцина на основе дендритных клеток, секретирующие GM-CSF клеточные вакцины, CpG-олигонуклеотиды, имиквимод); терапевтическое средство, которое ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, посредством ингибирования пути CTLA-4 и/или PD1/PD-L1/PD-L2 и/или сокращения количества или блокирования Treg или других иммуносупрессорных клеток; терапевтическое средство, которое стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, с использованием агонистов, которые стимулируют путь CD-137, OX-40 и/или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапевтическое средство, которое системно повышает встречаемость противоопухолевых Т-клеток; терапевтическое средство, которое сокращает количество T<sub>reg</sub> или ингибирует их, таких как T<sub>reg</sub> в опухоли, например, с использованием антагониста CD25 (например, даклизумаба) или путем сокращения количества ex vivo с использованием гранул со связанным антителом к CD25; терапевтическое средство, которое воздействует на функционирование супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапевтическое средство, которое усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); адоптивный перенос Т-клеток или NK-клеток, в том числе генетически модифицированных клеток, например клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR-T терапия); терапевтическое средство, которое ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназу (IDO), диоксигеназу, аргиназу или синтетазу оксида азота; терапевтическое средство, которое обращает/предотвращает анергию или истощение Т-клеток; терапевтическое средство, которое запускает активацию врожденного иммунитета и/или воспаления в сайте опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов или блокирование иммунодепрессивных цитокинов.

Агонистические антитела к GITR, описанные в настоящем документе, можно применять вместе с одним или несколькими из агонистических средств, которые связываются в качестве лиганда с положительно действующими костимулирующими рецепторами, блокирующих средств, которые ослабляют передачу сигнала через ингибирующие рецепторы, антагонистов и одного или нескольких средств, которые системно повышают встречаемость противоопухолевых Т-клеток, средств, которые ослабляют определенные иммунодепрессивные пути в опухолевом микроокружении (например, блокируют включение ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), сокращают количество T<sub>reg</sub> или ингибируют их (например, с использованием моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или путем сокращения количества ex vivo с использованием гранул со связанным антителом к CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают анергию или истощение Т-клеток), и средств, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаления

в сайтах опухолей.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR вводят субъекту вместе с ингибитором BRAF, если субъект является положительным по мутации BRAF V600.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR, которое вводят вместе с другим иммуностимулирующим антителом, представляет собой антитело, описанное в настоящем документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR, которое вводят вместе с другим иммуностимулирующим антителом, представляет собой антитело, имеющее последовательности CDR из 6C8, например гуманизованное антитело, имеющее CDR из 6C8, как описано, например, в международной заявке WO2006/105021; антитело, содержащее CDR из антитела к GITR, описанного в международной заявке WO2011/028683; антитело, содержащее CDR из антитела к GITR, описанного в японской патентной заявке JP2008278814, антитело, содержащее CDR из антитела к GITR, описанного в международной заявке WO2015/031667, или другое антитело к GITR, описанное или упомянутое в настоящем документе.

В настоящем документе предполагаются способы стимуляции иммунной реакции у субъекта, предусматривающие введение субъекту агонистической молекулы по отношению к GITR, например антитела, и одного или нескольких дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист по отношению к PD-1, например антагонистическое антитело, антагонист по отношению к PD-L1, например антагонистическое антитело, антагонист по отношению к CTLA-4, например антагонистическое антитело, и/или антагонист по отношению к LAG3, например антагонистическое антитело, таким образом, чтобы стимулировалась иммунная реакция у субъекта, например, для ингибирования роста опухоли или для стимуляции противовирусной реакции. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят агонистическое антитело к GITR и антагонистическое антитело к PD-1. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят агонистическое антитело к GITR и антагонистическое антитело к PD-L1. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят агонистическое антитело к GITR и антагонистическое антитело к CTLA-4. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к GITR представляет собой человеческое антитело, такое как антитело, описанное в настоящем документе. В качестве альтернативы антитело к GITR может представлять собой, например, химерное или гуманизованное антитело (например, полученное из мышинового mAb к GITR), такое как антитела, дополнительно описанные в настоящем документе. В соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антагонистическое антитело к PD-1, антагонистическое антитело к PD-L1, антагонистическое антитело к CTLA-4 и/или антагонистическое антитело к LAG3) представляет собой человеческое антитело. В качестве альтернативы по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизованное антитело (например, полученное из мышинового антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4 и/или антитела к LAG3).

В настоящем документе предполагаются способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту агонистического антитела к GITR и антагонистического антитела к PD-1. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-1 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. Также в настоящем документе предполагаются способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту антитела к GITR и субтерапевтической дозы антитела к PD-1. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и антитело к GITR представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10, описанные в настоящем документе (например, 28F3.IgG1 или 28F3.IgG1.1), или другое агонистическое антитело к GITR, описанное в настоящем документе.

Подходящие антагонисты PD-1 для применения в способах, описанных в настоящем документе, включают в себя без ограничения лиганды, антитела (например, моноклональные антитела и биспецифичные антитела) и мультивалентные средства. В соответствии с одним вариантом осуществления антагонист PD-1 представляет собой слитый белок, например Fc-слитый белок, такой как AMP-244. В соответствии с одним вариантом осуществления антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1.

Иллюстративным антителом к PD-1 является ниволумаб (BMS-936558) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные участки из одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в международной заявке WO 2006/121168. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD1 представляет собой МК-3475 (ламбролизумаб), описанное в международной заявке WO2012/145493; и AMP-514, описанное в международной заявке WO 2012/145493. Дополнительные известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают в себя описанные в международ-

ных заявках WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, патентах США № 7635757 и № 8217149 и публикации заявки на патент США № 2009/0317368. Можно применять любое из антител к PD-1, раскрытых в международной заявке WO2013/173223. Антитело к PD-1, которое конкурирует за связывание с одним из этих антител и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и одно из этих антител, также можно применять в методах комплексного лечения. Другим подходом для целенаправленного воздействия на PD-1 рецептор является рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена из PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-частью IgG1, называемый AMP-224.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-1 связывается с человеческим PD-1 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим PD-1 с  $K_D$ , составляющей  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим PD-1 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, или связывается с человеческим PD-1 с  $K_D$ , составляющей от  $1 \times 10^{-8}$  М до  $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

В настоящем документе предполагаются способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту агонистического антитела к GITR и антагонистического антитела к PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-L1 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе предполагаются способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту антитела к GITR и субтерапевтической дозы антитела к PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и антитело к GITR представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 и 6G10, описанные в настоящем документе (например, 28F3.IgG1 или 28F3.IgG1.1), или другое агонистическое антитело к GITR, описанное в настоящем документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (называемое 12A4 в международной заявке WO 2007/005874 и патенте США № 7943743) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные участки 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в РСТ публикации международной заявки WO 07/005874 и патенте США № 7943743. В соответствии с определенным вариантом осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (также известное как антитело к B7-H1), MPDL3280A (также известное как RG7446), MSB0010718C (WO2013/79174) или rHlgM12B7. Также можно применять любое из антител к PD-L1, раскрытых в международных заявках WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, патентах США № 7635757 и № 8217149 и публикации заявки на патент США № 2009/145493. Антитела к PD-L1, которые конкурируют с любым из этих антител и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, также можно применять в методах комплексного лечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 связывается с человеческим PD-L1 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим PD-L1 с  $K_D$ , составляющей  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим PD-L1 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, или связывается с человеческим PD-L1 с  $K_D$ , составляющей от  $1 \times 10^{-8}$  М до  $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

В настоящем документе предполагаются способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антитела к GITR, описанного в настоящем документе, и антагонистического антитела к CTLA-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к GITR вводят в субтерапевтической дозе, антитело к CTLA-4 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе предполагаются способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту антитела к GITR и субтерапевтической дозы антитела к CTLA-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой антитело, выбранное из группы: Yervoy™ (ипилиумаб или антитело 10D1, описанное в РСТ публикации международной заявки WO 01/14424), тремелиумаб (ранее трицилиумаб, CP-675,206), моноклональное антитело или антитело к CTLA-4, описанное в любой из следующих публикаций: международные заявки WO 98/42752; WO 00/37504; патент США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206) и Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. Можно применять любое из антител к CTLA-4, раскрытых в международной заявке WO2013/173223.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 связывается с человеческим CTLA-4 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим CTLA-4 с  $K_D$ ,

составляющей  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим CTLA-4 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, или связывается с человеческим CTLA-4 с  $K_D$ , составляющей от  $1 \times 10^{-8}$  М до  $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

В настоящем документе предполагаются способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антитела к GITR и антитела к LAG-3. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления антитело к GITR вводят в субтерапевтической дозе, антитело к LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе предполагаются способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту антитела к GITR и субтерапевтической дозы антитела к LAG-3. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и антитело к GITR представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки 28F3, 19D3, 18E10, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2 или 6G10, описанные в настоящем документе (например, 28F3.IgG1 или 28F3.IgG1.1), или другое агонистическое антитело к GITR, описанное в настоящем документе. Примеры антител к LAG3 включают в себя антитела, содержащие CDR или вариабельные участки из антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в публикации заявки на патент США № US2011/0150892, в международных заявках WO10/19570 и WO2014/008218. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к LAG-3 представляет собой BMS-986016. Другие принятые в уровне техники антитела к LAG-3, которые можно применять, включают в себя IMP731 и IMP-321, описанные в заявке на патент США № 2011/007023, международных заявках WO08/132601 и WO09/44273. Антитела к LAG-3, которые конкурируют с любым из этих антител и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, также можно применять в методах комплексного лечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к LAG-3 связывается с человеческим LAG-3 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим LAG-3 с  $K_D$ , составляющей  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с человеческим LAG-3 с  $K_D$ , составляющей  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, или связывается с человеческим LAG-3 с  $K_D$ , составляющей от  $1 \times 10^{-8}$  М до  $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

Введение антител к GITR, описанных в настоящем документе, и антагонистов, например антагонистических антител, одного или нескольких вторых антигенов-мишеней, таких как LAG-3, и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, может усилить иммунную реакцию в отношении злокачественных клеток у пациента. Злокачественные опухоли, чей рост можно ингибировать с помощью антител в соответствии с настоящим раскрытием, включают в себя злокачественные опухоли, которые, как правило, восприимчивы к иммунотерапии, и злокачественные опухоли, как правило, невосприимчивые к иммунотерапии. Типичные примеры злокачественных опухолей для лечения с использованием комплексной терапии в соответствии с настоящим раскрытием включают в себя те злокачественные опухоли, которые перечислены в настоящем документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления комбинацию терапевтических антител, обсуждаемых в настоящем документе, можно вводить одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом носителе. В соответствии с другим вариантом осуществления комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Например, антитело к CTLA-4 и антитело к GITR можно вводить последовательно, как, например, антитело к CTLA-4 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, или антитело к GITR вводят первым, а антитело к CTLA-4 - вторым. В качестве дополнения или альтернативы, антитело к PD-1 и антитело к GITR можно вводить последовательно, как, например, антитело к PD-1 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, или антитело к GITR вводят первым, а антитело к PD-1 - вторым. В качестве дополнения или альтернативы, антитело к PD-L1 и антитело к GITR можно вводить последовательно, как, например, антитело к PD-L1 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, или антитело к GITR вводят первым, а антитело к PD-L1 - вторым. В качестве дополнения или альтернативы, антитело к LAG-3 и антитело к GITR можно вводить последовательно, как, например, антитело к LAG-3 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, или антитело к GITR вводят первым, а антитело к LAG-3 - вторым.

Более того, если более чем одну дозу в ходе комплексной терапии вводят последовательно, порядок последовательного введения можно сменить на обратный или же сохранять тот же порядок при каждом моменте введения, последовательные введения можно комбинировать с одновременными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации антитела к CTLA-4 и антитела к GITR может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к CTLA-4 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, и третье введение может быть последовательным, прием антитело к GITR вводят первым, а антитело к CTLA-4 - вторым, и т.д. В качестве дополнения или альтернативы, первое введение комбинации антитела к PD-1 и антитела к GITR может быть одно-

временным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к PD-1 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, и третье введение может быть последовательным, причем антитело к GITR вводят первым, а антитело к PD-1 - вторым, и т.д. В качестве дополнения или альтернативы, первое введение комбинации антитела к PD-L1 и антитела к GITR может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к PD-L1 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, и третье введение может быть последовательным, причем антитело к GITR вводят первым, а антитело к PD-L1 - вторым, и т.д. В качестве дополнения или альтернативы, первое введение комбинации антитела к LAG-3 и антитела к GITR может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к LAG-3 вводят первым, а антитело к GITR - вторым, и третье введение может быть последовательным, причем антитело к GITR вводят первым, а антитело к LAG-3 - вторым, и т.д. Другой типичный режим дозирования может включать первое введение, которое является последовательным, причем антитело к GITR вводят первым, а антитело к CTLA-4 (и/или антитело к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3) - вторым, а последующие введения могут быть одновременными.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD137 (4-1BB), такой как агонистическое антитело к CD137. Подходящие антитела к CD137 включают в себя, например, урелумаб или PF-05082566 (WO12/32433).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист OX40, такой как агонистическое антитело к OX40. Подходящие антитела к OX40 включают в себя, например, MEDI-6383, MEDI-6469 или MOXR0916 (RG7888; WO06/029879).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD40, такой как агонистическое антитело к CD40. В соответствии с определенными вариантами осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист CD40, такой как антагонистическое антитело к CD40. Подходящие антитела к CD40 включают в себя, например, лукатумумаб (HCD122), дацетузумаб (SGN-40), CP-870,893 или Chi Lob 7/4.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD27, такой как агонистическое антитело к CD27. Подходящие антитела к CD27 включают в себя, например, варлилумаб (CDX-1127).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой MGA271 (для V7H3) (WO11/109400).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист KIR, такой как лирилумаб.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают в себя, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) или F001287.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист Toll-подобного рецептора, например агонист TLR2/4 (например, бактерия Кальмета-Герена); агонист TLR7 (например, хилтонол или имиквимод); агонист TLR7/8 (например, резиквимод) или агонист TLR9

(например, CpG7909).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту антитела к GITR и иммуноонкологического средства, причем иммуноонкологическое средство представляет собой ингибитор TGF- $\beta$ , например GC1008, LY2157299, TEW7197 или IMC-TR1.

В соответствии с одним аспектом антитело к GITR вводят последовательно перед введением второго средства, например иммуноонкологического средства. В соответствии с одним аспектом антитело к GITR вводят одновременно со вторым средством, например иммуноонкологическим средством. В соответствии с еще одним аспектом антитело к GITR вводят последовательно после введения второго средства. Введение двух средств может начинаться в моменты времени, которые разделены, например, 30, 60, 90, 120 мин, 3, 6, 12, 24, 36, 48 ч, 3, 5, 7 сутками или одной или несколькими неделями, или введение второго средства может начинаться, например, через 30, 60, 90, 120 мин, 3, 6, 12, 24, 36, 48 ч, 3, 5, 7 суток или одну или несколько недель после того, как было введено первое средство.

В соответствии с определенными аспектами антитело к GITR и второе средство, например иммуноонкологическое средство, вводят пациенту одновременно, например вводят одновременно посредством инфузии, например, в течение периода, составляющего 30 или 60 мин. Антитело к GITR можно составить совместно со вторым средством, например иммуноонкологическим средством.

Необязательно, антитело к GITR в виде отдельного иммунотерапевтического средства или комбинации антитела к GITR и одного или нескольких дополнительных иммунотерапевтических антител (например, блокада антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3) можно дополнительно комбинировать с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать, включают в себя пептиды из антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно обсуждаются ниже). Активацию GITR в комбинации с одним или несколькими дополнительными антителами (например, блокада CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно дополнительно комбинировать со стандартными методами лечения злокачественных опухолей. Например, активацию GITR в комбинации с одним или несколькими дополнительными антителами (например, блокада CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими схемами. В этих случаях представляется возможным снижение дозы другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией согласно настоящему раскрытию (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация агонистического антитела к GITR с дополнительным антителом или без дополнительного антитела, такого как антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3, и дополнительного декарбазина для лечения меланомы. Другим примером является комбинация антитела к GITR с антителами к CTLA-4, и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3 или без них и дополнительного интерлейкина-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения активации GITR и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 с химиотерапией является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить в результате к повышенным уровням опухолевого антигена в рамках пути презентирования антигена. Другие методы комплексной терапии, которые могут приводить в результате к синергизму с активацией GITR в комбинации с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 или без такой блокады вследствие гибели клеток, включают в себя радиационное облучение, хирургическое вмешательство или выключение эндокринной функции. При каждом из этих протоколов создается источник опухолевого антигена у хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также можно комбинировать с активацией GITR в комбинации с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3. Ингибирование ангиогенеза ведет к гибели опухолевых клеток, которые могут быть источником направления опухолевого антигена в пути презентирования антигена у хозяина. Агонистическое антитело к GITR в качестве отдельного иммунотерапевтического средства или комбинацию агонистических в отношении GITR и блокирующих CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 антител можно применять в комбинации с биспецифичными антителами, которые нацеливают экспрессирующие Fc $\alpha$ - или Fc $\gamma$ -рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243). Биспецифичные антитела можно применять для целенаправленного воздействия на два отдельных антигена. Т-клеточное звено в этих реакциях будет дополняться применением комбинированной активации GITR и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3.

В другом примере агонистическое антитело к GITR в виде отдельного иммунотерапевтического средства или комбинацию антитела к GITR и дополнительного иммуностимулирующего средства, на-

пример антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или средства, воздействующего на LAG-3, например антитела, можно применять в сочетании с антителом к злокачественным новообразованиям, таким как Rituxan® (ритуксимаб), Herceptin® (трастузумаб), Vectar® (тоситумомаб), Zevalin® (ибритумомаб), Campath® (алемтузумаб), Lymphocide® (эпртузумаб), Avastin® (бевацизумаб) и Tarceva® (эрлотиниб) и т.п. В качестве примера, и не вдаваясь в теорию, лечение использованием антитела к злокачественной опухоли или антитела к злокачественной опухоли, конъюгированного с токсином, может вести к гибели клеток злокачественной опухоли (например, опухолевых клеток), которая будет усиливать иммунную реакцию, опосредованную иммуностимулирующим средством, например средством, воздействующим на GITR, CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3, например антителом. В соответствии с иллюстративным вариантом осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) может включать в себя противораковое средство, например антитело, в комбинации с антителом к GITR и необязательно дополнительное иммуностимулирующее средство, например средство, противодействующее CTLA-4, и/или противодействующее PD-1, и/или противодействующее PD-L1, и/или противодействующее LAG-3, например антитело, одновременно или последовательно или любую их комбинацию, которая может усиливать противоопухолевые иммунные реакции у хозяина.

Опухоли ускользают от иммунологического надзора хозяина посредством обширного ряда механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммунодепрессивными. Они включают в себя, среди прочих, TGF- $\beta$  (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), и Fas лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждой из этих молекул можно дополнительно комбинировать с антителом к GITR с дополнительным иммуностимулирующим средством или без дополнительного иммуностимулирующего средства, например средства, противодействующего CTLA-4, и/или противодействующего PD-1, и/или противодействующего PD-L1, и/или противодействующего LAG-3, такого как антитело, для противодействия эффектам иммунодепрессивных средств и поддержки иммунным реакциям против опухоли у хозяина.

Другие средства, например антитела, которые можно применять для активации иммунологической реактивности у хозяина, можно также применять в комбинации с антителом к GITR с дополнительным иммуностимулирующим средством или без дополнительного иммуностимулирующего средства, такого как антитело к CTLA-4, и/или антитело к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентирование антигена. Антитела к CD40 (Ridge et al., выше) можно применять в сочетании с антителом к GITR и необязательно с дополнительным иммуностимулирующим средством, например средством, противодействующим CTLA-4, и/или противодействующим PD-1, и/или противодействующим PD-L1, и/или противодействующим LAG-3, например, антителом. Другие активирующие антитела к костимулирующим молекулам Т-клеток, Weinberg et al., выше, Melero et al. выше, Hutloff et al., выше, также можно обеспечивать для повышенных уровней активации Т-клеток.

Как обсуждалось выше, в настоящее время трансплантацию костного мозга применяют для лечения ряда опухолей гемопозитического происхождения. Иммунотерапию антителом к GITR самим по себе или в комбинации с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 можно применять для повышения эффективности пересаженных от донора опухолеспецифичных Т-клеток.

Несколько экспериментальных лечебных протоколов, которые включают *ex vivo* активацию и разращивание антигенспецифичных Т-клеток и адаптивный перенос этих клеток реципиентам для получения антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell, выше). Эти способы также можно применять для активации Т-клеточных реакций в отношении инфекционных агентов, таких как CMV. Можно ожидать, что *ex vivo* активация в присутствии антитела к GITR с дополнительным иммуностимулирующим терапевтическим средством или без дополнительного терапевтического иммуностимулирующего средства, например антител к CTLA-4, и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3, повышает встречаемость и активность подвергнутых адаптивному переносу Т-клеток.

В настоящем документе предполагаются способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту антитела к GITR со средством, противодействующим CTLA-4, и/или противодействующим PD-1, и/или противодействующим PD-L1, и/или противодействующим LAG-3, например, антителом, или без него. Например, способы, описанные в настоящем документе, предполагают способ снижения частоты возникновения колита или диареи, вызванных иммуностимулирующим терапевтическим антителом, посредством введения пациенту непоглощаемого стероида. Как используется в настоящем документе, "непоглощаемый стероид" представляет собой глюкокортикоид, для которого проявляется значительный пресистемный метаболизм таким образом, что после метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. составляет менее приблизительно 20%. В соответствии с одним вариантом осуществления, описанным в настоящем документе, непоглощаемый стероид представляет собой будесонид. Будесонид является локально действующим глюкокортикостероидом, который значительно метаболизируется, преимуще-

ственно печени, после перорального введения. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой pH-зависимый и зависимый от времени пероральный состав будесонида, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и по толстой кишке. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения болезни Крона со степенью тяжести от легкой до умеренной, затрагивающей подвздошную кишку и/или восходящую ободочную кишку. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC® для лечения болезни Крона составляет 6-9 мг/сутки. ENTOCORT EC® высвобождается в кишечнике до поглощения и удерживается в слизистой кишки. После того как он проходит через являющуюся мишенью ткань слизистой кишки, ENTOCORT EC® значительно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени в метаболиты с пренебрежимо малой глюкокортикоидной активностью. Вследствие этого биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит в результате к улучшенному терапевтическому индексу по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее значительным пресистемным метаболизмом. Будесонид приводит в результате к меньшим неблагоприятным эффектам, в том числе меньшему подавлению гипоталамо-гипофизарной системы, чем системно действующие кортикостероиды. Тем не менее, хроническое введение ENTOCORT EC® может приводить в результате к системным эффектам глюкокортикоидов, таким как гиперкортицизм и адrenaльная супрессия; см. PDR 58<sup>th</sup> ed. 2004; 608-610.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления активацию GITR с блокадой или без блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 (т.е. иммуностимулирующими терапевтическими антителами к GITR и необязательно антителами к CTLA-4, и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3) в сочетании с непоглощаемым стероидом можно дополнительно комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают в себя 5-ASA средства, такие как, например, сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); и месаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, введение салицилата в комбинации с антителом к GITR с или без антител к CTLA-4, и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3 и непоглощаемым стероидом может включать в себя любое накладывающееся или последовательное введение салицилата и непоглощаемого стероида с целью снижения частоты возникновения колита, вызванного иммуностимулирующими антителами. Таким образом, например, способы снижения частоты возникновения колита, вызванного иммуностимулирующими антителами, описанными в настоящем документе, охватывают введение салицилата и непоглощаемого стероида одновременно, или последовательно (например, салицилат вводят через 6 ч после непоглощаемого стероида), или в любой их комбинации. Кроме того, салицилат и непоглощаемый стероид можно вводить тем же путем (например, оба вводят перорально) или разными путями (например, салицилат вводят перорально, а непоглощаемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от пути(путей), используемого для введения антитела к GITR и антител к CTLA-4, и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3.

Антитела к GITR и комбинацию терапевтических средств на основе антител, описанных в настоящем документе, также можно применять в сочетании с другими широко известными терапевтическими средствами, которые выбирают, исходя из их конкретной применимости в отношении показания для лечения (например, злокачественной опухоли).

Комбинации антител к GITR, описанных в настоящем документе, можно применять последовательно с известными фармацевтически приемлемым средством(средствами).

Например, антитела к GITR и комбинацию терапевтических средств на основе антител, описанных в настоящем документе, можно применять в комбинации (например, одновременно или отдельно) с дополнительным методом лечения, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина-паклитаксела (Taxol), доксорубицина, 5-fu или камптотецина + аро21/TRAIL (6-кратное комбинированное применение)), один или несколько ингибиторов протеасомы (например, бортезомиб или MG132), один или несколько ингибиторов Bcl-2 (например, BH3I-2' (bcl-x1 ингибитор), ингибитор индоламиндиоксигеназы-1 (например, INCB24360, индоксимод, NLG-919 или F001287), AT-101 (R-(-)-госипольное производное), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклак) или антагонисты MCL-1 (белок дифференцировки клетки миелолейкоза 1)), антагонисты iAP (ингибитор белков апоптоза) (например, smac7, smac4, малая молекула-миметик smac, синтетические пептиды smac (см. Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308), или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондеацетилазы), антитела к CD20 (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, целенаправленно воздействующие на VEGF и VEGFR (например, авастин), синтетические тритерпеноиды (см. Huer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточный белок-ингибитор FLICE) (например, натуральные и синтетические лиганды PPAR $\gamma$  ( $\gamma$  рецептор, активируемый пролифератором пероксисом), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназ (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролиму, ингибито-

ры mTOR, такие как рапамицин и темсиролимус, бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-AKT, леналидомид, ингибиторы GSK3P, ингибиторы IAP и/или генотоксичные лекарственные средства.

Антитела к GITR и комбинацию терапевтических средств на основе антител, описанных в настоящем документе, можно дополнительно применять в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые можно применять в качестве антипролиферативных цитотоксических средств, включают в себя без ограничения следующие.

Алкилирующие средства (в том числе без ограничения азотистые иприты, этилениминовые производные, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™) фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамин, бусульфид, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (в том числе без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, пиримидиновые аналоги, пуриновые аналоги и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксурин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные средства для объединения с агонистическими антителами к GITR включают в себя без ограничения таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как TAXOL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорусид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон В1, [17]-дегидродезоксипотилон В, [18]дегидродезоксипотилоны В, C<sub>12,13</sub>-циклопропил-эпотилон А, C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>-мостиковый эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-дезметилэпотилон В, эпотилон В10, дискодермолид, патупилон (ЕРО-906), КОS-862, КОS-1584, ZK-ЕРО, АВJ-789, ХАА296А (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), халихондрин В, эрибулин мезилат (Е-7389), гемиастерлин (НТИ-286), Е-7974, криптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты с майтанзиноидом (DM-1), МКС-1, АВТ-751, Т1-38067, Т-900607, SB-715992 (испинесиб), SB-743921, МК-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклостерпин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1 в дополнение к другим средствам, стабилизирующим микротрубочки, известным в уровне техники.

В случаях, когда желательно сделать aberrantly пролиферирующие клетки неактивными совместно с лечением с использованием антител к GITR, описанных в настоящем документе, или перед ним, гормоны и стероиды (в том числе синтетические аналоги), такие как 17α-этинилэстрадиол, диэтилстильбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместрон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклотеимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, леупролид, флутамид, торемифен, ZOLADEX™, также можно вводить пациенту. При использовании способов или композиций, описанных в настоящем документе, в случае необходимости также можно вводить другие средства, применяемые в модулировании роста или метастазирования опухоли в клинических условиях, такие как антимитотики.

Способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств известны специалистам в данной области техники. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих из химиотерапевтических средств описано в Настольном справочнике врача (Physicians' Desk Reference (PDR)), например, редакции 1996 г. (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки на него.

Химиотерапевтическое средство(средства) и/или лучевая терапия можно назначать в соответствии с терапевтическими протоколами, широко известными в уровне техники. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что назначение химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии может изменяться в зависимости от заболевания, подлежащего лечению, и от известных эффектов химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии в отношении данного заболевания. В соответствии со знаниями клинического врача терапевтические протоколы (например, величины дозы и время введения) также можно изменять, принимая во внимание наблюдаемые воздействия вводимых терапевтических средств на пациента и принимая во внимание наблюдаемые реакции заболевания на вводимые терапевтические средства.

#### **Иллюстративные варианты осуществления**

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с человеческим индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) и проявляют следующие свойства:

- связываются с растворимым человеческим GITR;
- связываются с мембраносвязанным человеческим GITR;
- связываются с мембраносвязанным GITR яванского макака;
- индуцируют или усиливают активацию Т-клеток;
- ингибируют связывание лиганда GITR с GITR на 3A9-hGITR клетках;
- не более чем частично ингибируют связывание лиганда GITR с GITR на активированных Т-

клетках;

(g) связываются с конформационным эпитопом на зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4);

(h) связываются как с O-связанным и N-гликозилированным, так и с негликозилированным человеческим GITR;

(i) характеризуются агонистической активностью в отсутствие связывания с Fc-рецептором, но при этом связывание с Fc-рецептором дополнительно усиливает агонистическую активность; и

(i) конкурируют в любом из направлений или в обоих направлениях с одним или несколькими из антител 28F3, 3C3-1, 3C3-2, 2G6, 8A6, 9G7-1, 9G7-2, 14E3, 19H8-1, 19H8-2, 19D3, 18E10 и 6G10 за связывание с человеческим GITR.

2. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 1, причем антитело стимулирует противоопухолевую иммунную реакцию.

3. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантами осуществления 1 или 2, причем антитело стимулирует антигенспецифичную T-клеточную реакцию.

4. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело повышает продукцию IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в экспрессирующих GITR T-клетках.

5. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело повышает пролиферацию T-клеток.

6. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело не связывается с Fc-рецепторами.

7. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с одним или несколькими активирующими Fc $\gamma$ R.

8. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с растворимым человеческим GITR с  $K_D$ , составляющей 10 нМ или менее при измерении с помощью метода Biacore.

9. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с мембраносвязанным человеческим GITR с  $K_D$ , составляющей 1 нМ или менее при измерении по Скэтчарду.

10. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с мембраносвязанным человеческим GITR с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее при измерении с помощью метода FACS.

11. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с мембраносвязанным GITR яванского макака с  $EC_{50}$ , составляющей 10 нМ или менее при измерении с помощью метода FACS.

12. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело индуцирует или усиливает активацию T-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур.

13. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело ингибирует связывание лиганда GITR с GITR с  $EC_{50}$ , составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS.

14. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с PTGGPGCGPGRLLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYP-GEE (SEQ ID NO: 218) в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4).

15. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфично связываются с индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) и содержат три CDR вариативного участка тяжелой цепи и три CDR вариативного участка легкой цепи, которые находятся в парах из вариативного участка тяжелой цепи и вариативного участка легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 13 и 14;

(b) SEQ ID NO: 26 и 27;

(c) SEQ ID NO: 39 и 40;

(d) SEQ ID NO: 52 и 53;

(e) SEQ ID NO: 52 и 54;

(f) SEQ ID NO: 71 и 72;

(g) SEQ ID NO: 84 и 85;

(h) SEQ ID NO: 97 и 98;

(i) SEQ ID NO: 97 и 99;

(j) SEQ ID NO: 115 и 116;

(k) SEQ ID NO: 128 и 129;

(l) SEQ ID NO: 128 и 130 и

(m) SEQ ID NO: 335 и 336.

16. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR), содержащие:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 46, 47 и 48 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 65, 66 и 67 соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 68, 69 и 70 соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 78, 79 и 80 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 81, 82 и 83 соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 91, 92 и 93 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 94, 95 и 96 соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 106, 107 и 108 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 109, 110 и 111 соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 106, 107 и 108 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 122, 123 и 124 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 125, 126 и 127 соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 138, 139 и 140 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 141, 142 и 143 соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 138, 139 и 140 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 144, 145 и 146 соответственно; или

(m) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 342, 343 и 344 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 345, 346 и 347 соответственно.

17. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 16, причем антитело содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно.

18. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 16, причем антитело содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно.

19. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 16, причем антитело содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 46, 47 и 48 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно.

20. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) и содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 71, 84, 97, 115, 128 и 335.

21. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) и содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной

из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 27, 40, 53, 54, 72, 85, 98, 99, 116, 129, 130 и 336.

22. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) и содержат последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 26 и 27 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 39 и 40 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 52 и 53 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 52 и 54 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 84 и 85 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 97 и 98 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 97 и 99 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 115 и 116 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 128 и 129 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 128 и 130 соответственно и
- (m) SEQ ID NO: 335 и 336 соответственно.

23. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 22, причем вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную вариабельным участкам тяжелой и легкой цепей, выбранным из группы, состоящей из (a)-(m).

24. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 23, причем вариабельный участок тяжелой и легкой цепей содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную вариабельным участкам тяжелой и легкой цепей, выбранным из группы, состоящей из (a)-(m).

25. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 24, причем вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из (a)-(m).

26. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 25, причем антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 13, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14.

27. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 25, причем антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 26, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 27.

28. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 25, причем антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 39, и/или вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 40.

29. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) и содержат последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичные аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 15 и 16 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 17 и 19 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 30 и 32 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 31 и 32 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 43 и 45 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 44 и 45 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 55 и 56 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 55 и 57 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 58 и 60 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 59 и 60 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 58 и 61 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 59 и 61 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 75 и 77 соответственно;

- (r) SEQ ID NO: 76 и 77 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 86 и 87 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 88 и 90 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 89 и 90 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 102 и 104 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 103 и 104 соответственно;
- (x) SEQ ID NO: 100 и 101 соответственно;
- (y) SEQ ID NO: 100 и 371 соответственно;
- (z) SEQ ID NO: 102 и 105 соответственно;
- (za) SEQ ID NO: 103 и 105 соответственно;
- (zb) SEQ ID NO: 117 и 118 соответственно;
- (zc) SEQ ID NO: 119 и 121 соответственно;
- (zd) SEQ ID NO: 120 и 121 соответственно;
- (ze) SEQ ID NO: 131 и 132 соответственно;
- (zf) SEQ ID NO: 134 и 136 соответственно;
- (zg) SEQ ID NO: 135 и 136 соответственно;
- (zh) SEQ ID NO: 131 и 133 соответственно;
- (zi) SEQ ID NO: 134 и 137 соответственно;
- (zj) SEQ ID NO: 135 и 137 соответственно;
- (zk) SEQ ID NO: 337 и 338 соответственно;
- (zl) SEQ ID NO: 339 и 341 соответственно и
- (zm) SEQ ID NO: 340 и 341 соответственно.

30. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 29, причем тяжелая и легкая цепи содержат тяжелую и легкую цепи, выбранные из группы, состоящей из (a)-(zm).

31. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 30, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 19.

32. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 30, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 19.

33. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые (a) связываются с тем же эпитопом на GITR, что и антитело в соответствии с вариантом осуществления 25, и (b) ингибируют связывание антитела в соответствии с вариантом осуществления 25 с GITR на активированных Т-клетках по меньшей мере на 90% при измерении с помощью метода FACS.

34. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-33, причем антитело связывается с PTGGPGCGPGRLLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4).

35. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-34, причем антитело связывается как с человеческим GITR, так и с GITR яванского макака.

36. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его варианта.

37. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 36, причем антитело представляет собой антитело IgG1.

38. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 36, причем антитело содержит Fc IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией.

39. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 38, причем антитело или его антигенсвязывающая часть содержит Fc IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией, который содержит следующие мутации: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

40. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 36, причем антитело или его антигенсвязывающая часть содержит Fc, характеризующийся усиленным связыванием с активирующим FcγR.

41. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которых метиониновые остатки в CDR участках заменены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислению.

42. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-41, причем антитело или его антигенсвязывающая часть представляют собой человеческое или гуманизированное антитело.

43. Биспецифичная молекула, содержащая антитело в соответствии с любым из предыдущих вари-

антов осуществления, связанное с молекулой, которая характеризуется второй специфичностью связывания.

44. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменный участок тяжелой и/или легкой цепи в антителе или его антигенсвязывающей части в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-42.

45. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 44.

46. Клетка, трансформированная вектором экспрессии в соответствии с вариантом осуществления 45.

47. Иммуноконъюгат, содержащий антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-42, связанное со средством.

48. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть, биспецифичную молекулу или иммуноконъюгат в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 и носитель.

49. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, или биспецифичную молекулу, или иммуноконъюгат в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 и инструкции к применению.

50. Способ получения антитела к GITR или его антигенсвязывающей части, предусматривающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части в клетке в соответствии с вариантом осуществления 46 и выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки.

51. Способ стимуляции антигенспецифичной Т-клеточной реакции, предусматривающий приведение Т-клетки в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью, биспецифичной молекулой или иммуноконъюгатом по любому в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 таким образом, чтобы стимулировалась антигенспецифичная Т-клеточная реакция.

52. Способ активации или костимуляции эффекторной Т-клетки, предусматривающий приведение эффекторной Т-клетки в контакт с антителом к GITR или его антигенсвязывающей частью, биспецифичной молекулой или иммуноконъюгатом в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 и CD3, причем эффекторная Т-клетка активируется или подвергается костимуляции.

53. Способ повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в Т-клетке, предусматривающий приведение Т-клетки в контакт с эффективным количеством антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47.

54. Способ повышения пролиферации Т-клеток, предусматривающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47.

55. Способ повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в Т-клетках у субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 для повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  из Т-клеток.

56. Способ снижения или сокращения количества регуляторных Т-клеток в опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47, причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуется эффекторной или усиленной эффекторной функцией, для снижения количества регуляторных Т-клеток в опухоли.

57. Способ стимуляции иммунной реакции у субъекта, предусматривающий введение антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 субъекту таким образом, чтобы у субъекта стимулировалась иммунная реакция.

58. Способ в соответствии с вариантом осуществления 57, при котором субъект имеет опухоль, и стимулируется иммунная реакция в отношении опухоли.

59. Способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 таким образом, чтобы ингибировался рост опухоли у субъекта.

60. Способ лечения злокачественной опухоли, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43 и 47 для лечения злокачественной опухоли.

61. Способ в соответствии с вариантом осуществления 60, при котором злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из: злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли матки/злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичка, злокачественной опухоли пищевода, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, зло-

качественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли толстой и прямой кишки, злокачественной опухоли толстой кишки, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли желудка, герминогенной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли кости, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли кожи, злокачественных новообразований центральной нервной системы, лимфомы, лейкоза, миеломы, саркомы и злокачественной опухоли, связанной с вирусом.

62. Способ в соответствии с вариантом осуществления 60 или 61, при котором злокачественная опухоль представляет собой метастазирующую злокачественную опухоль, невосприимчивую к лечению злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

63. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 56-62, дополнительно предусматривающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

64. Способ в соответствии с вариантом осуществления 63, при котором дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело к PD1, антитело к LAG-3, антитело к CTLA-4 или антитело к PD-L1.

65. Способ выявления наличия индуцируемого глюкокортикоидами TNF-рецептора (GITR) в образце, предусматривающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-42 при условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом или его антигенсвязывающей частью и GITR, и выявление образования комплекса.

66. Выделенное антитело к GITR, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2 и по меньшей мере один из CH1, CH2 и CH3, которые не относятся к изотипу IgG2, причем антитело к GITR характеризуется повышенной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом к GITR, но с шарниром, не являющемся шарниром IgG2.

67. Выделенное антитело к GITR в соответствии с вариантом осуществления 66, в котором модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 223-226 и 283-290, или константный участок тяжелой цепи, который отличается от них не более чем 5 аминокислотами или является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 223-226 и 283-290.

68. Выделенное антитело к GITR в соответствии с вариантом осуществления 67, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 и 362, или тяжелую цепь, которая отличается от них не более чем 10 аминокислотами или является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, 17, 18, 28, 30, 31, 41, 43, 44, 55, 58, 59, 73, 75, 76, 86, 88, 89, 100, 102, 103, 117, 119, 120, 131, 134, 135, 227-275, 337, 339, 340, 348-352, 361 и 362.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует толковать как дополнительное ограничение. Содержание всех чертежей и всех источников, последовательности из Genbank, патенты и опубликованные патентные заявки, цитируемые в данной заявке, специально включены в данный документ посредством ссылки. В частности, раскрытия PCT публикаций международных заявок WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863 и PCT/US2013/072918 и публикация заявки на патент США № 2011/0150892 специально включены в данный документ посредством ссылки.

### Примеры

Пример 1. Получение разных антител к GITR.

Человеческие моноклональные антитела к GITR получали в линиях Hco7, Hco27, Hco20, Hco12, Hco17 и Hc2 трансгенных мышей HuMAb® ("HuMAb" является торговым названием Medarex, Inc., Принстон, Нью-Джерси) и КМ-мышей (линия КМ Mouse® содержит трансхромосому SC20, которая описана в PCT публикации международной заявки WO 02/43478). Мышей HC2/KCo27 HuMAb и КМ-мышей получали, как описано в патентах США № 5770429 и 5545806, полные раскрытия которых тем самым включены в данный документ посредством ссылки.

Всего 94 мыши, в том числе 7 генотипов трансгенных мышей (КМ, Hco7, Hco27, Hco20, Hco12, Hco17 и Hc2), иммунизировали в соответствии с разными стратегиями иммунизации (разный антиген, разные дозы, длительность, пути введения (в подушечку стопы (fp), внутривенно (iv) и подкожно (sc)) и адъювант (CFA/LFA, Райби и антитело) и т.д.). Провели 36 слияний из 54 мышей, и их подвергли скринингу. 157 антител идентифицировали из этих 36 слияний, и дополнительная характеристика привела к выделению антител, представляющих особый интерес, в том числе антител, обозначенных как 28F3, 19D3, 18E10, 3C3, 2G6, 8A6, 9G7, 14E3, 19H8 и 6G10.

В ходе секвенирования кДНК идентифицировали одну тяжелую и одну легкую цепи для каждого из антител 28F3, 19D3, 18D10, 2G6, 8A6, 14E3 и 6G10, и одну тяжелую цепь и две легкие цепи (легкая цепь

1 или "L1" и легкая цепь 2 или "L2") для каждого из антител 3C3, 9G7 и 19H8. С помощью анализа белка идентифицировали отдельную легкую цепь для антител 3C3 и 9G7, и с помощью секвенирования N-концевой части и определения молекулярного веса показали, что она представляла собой легкую цепь L1 для 3C3 и легкую цепь L2 для 9G7. Что касается антитела 19H8, 93% антител, экспрессируемых гибридомой, содержали легкую цепь L1, а 3% содержали легкую цепь L2. Антитела 3C3-1 и 3C3-2 соответствуют антителу 3C3 с легкой цепью L1 и L2 соответственно. Антитела 9G7-1 и 9G7-2 соответствуют антителу 9G7 с легкой цепью L1 и L2 соответственно. Антитела 19H8-1 и 19H8-2 соответствуют антителу 19H8 с легкой цепью L1 и L2 соответственно. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности каждой из легких цепей у 3 антител приведены в табл. 11.

Аминокислотные последовательности варибельного участка и изотип антител 28F3, 19D3, 18E10, 3C3 (3C3-1 и 3C3-2), 2G6, 8A6, 9G7 (9G7-1 и 9G7-2), 14E3, 19H8 (19H8-1 и 19H8-2) и 6G10 изложены на фиг. 2-31. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности легкой и тяжелой цепей у каждого антитела приведены в табл. 11. Тяжелая и легкая цепи 28F3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15 и 16. Тяжелая и легкая цепи 19D3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28 и 29. Тяжелая и легкая цепи 18E10 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 41 и 42. Тяжелая и легкая цепи 3C3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55 и 56. Тяжелая и легкая цепи 2G6 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 73 и 74. Тяжелая и легкая цепи 8A6 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 86 и 87. Тяжелая и легкая цепи 9G7 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 100 и 101. Тяжелая и легкая цепи 14E3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 117 и 118. Тяжелая и легкая цепи 19H8-1 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 131 и 132. Тяжелая и легкая цепи 19H8-2 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 131 и 133. Тяжелая и легкая цепи 6G10 состоят из аминокислотных последовательностей 337 и 338. Нуклеотидные последовательности, кодирующие эти белки, приведены в табл. 11.

Пример 2. Связывание антител к GITR с активированными человеческими Т-клетками и Т-клетками яванского макака.

Человеческие моноклональные антитела к GITR, полученные в примере 1, исследовали в отношении связывания с активированными человеческими Т-клетками и Т-клетками яванского макака, которые экспрессируют GITR на своей поверхности.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), выделенные из человека или яванского макака, активировали нанесенным в виде покрытия на планшет антителом к CD3 (клон: UCNT1 для активации человеческих Т-клеток; клон: SP34 для активации Т-клеток яванского макака; оба от BD Biosciences) и растворимым антителом к CD28 (клон: CD28.2 как для человека, так и для яванского макака, BD Biosciences) в течение 4 суток (человек) или 5 суток (яванский макак). Клетки исследовали в отношении связывания с mAb к GITR в анализе на основе флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS) с использованием конъюгированного с фикоэритрином (PE) антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch). Образцы анализировали на проточном цитометре BD FACS Canto.

Антитела к GITR 3C3, 19D3, 18E10 и 28F3 связывались с активированными Т-клетками как человека, так и яванского макака. Как показано на фиг. 32, антитела 3C3, 19D3, 18E10 и 28F3 крепко связывались с активированными человеческими Т-клетками, что отражалось в значениях EC50, составляющих 0,04916, 0,3633, 0,1461 и 0,1916 нМ соответственно. Аналогично, антитела 18E10 и 28F3 связывались с активированными Т-клетками яванского макака со значениями EC50 для 18E10 и 28F3, составляющими 0,9134 и 1,044 нМ соответственно (фиг. 33). 3C3 не связывалось существенно с Т-клетками яванского макака.

Пример 3. Связывание антител к GITR с растворимым GITR.

Связывание антител к GITR с растворимым GITR определяли с помощью метода Biacore. Антитела к GITR захватывали на чипах, покрытых человеческими каппа-цепями (~5KRU; Southernbiotech, № 2060-01 в каталоге), и обеспечивали поток рекомбинантного человеческого GITR (rHGITR/Fc; R&D systems, № 689-GR в каталоге) вдоль чипа в концентрациях 500, 250, 125, 62 и 31 нМ. Концентрация захватываемого mAb в объеме составляла 2-40 мкг/мл (5 мкл при 10 мкл/мин.). Время ассоциации с антигеном составляло 5 мин при 15 мкл/мин, время диссоциации с антигеном составляло 6 мин, а регенерацию осуществляли с использованием 50 мМ HCl/50 мМ NaOH (12 мкл каждый при 100 мкл/мин.). Результаты, полученные с 28F3 и несколькими другими антителами к GITR, приведены в табл. 5.

Таблица 5

MAb к GITR	Человеческий антиген GITR (захват антитела на капла- цепь)		
	$k_a$ (1/М с)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
2G6	1,23E+05	1,47E-03	1,20E-08
Субклон 1 3С3	4,14E+05	5,52E-03	1,33E-08
18E10	1,82E+05	2,41E-03	1,33E-08
Субклон 2 3С3	4,30E+05	6,20E-03	1,44E-08
28F3	3,97E+05	5,89E-03	1,48E-08
19D3	2,76E+05	4,50E-03	1,63E-08
9G7	2,14E+05	7,48E-03	3,50E-08
6G10	3,83E+05	7,15E-04	1,87E-09

Результаты указывают на то, что антитела к GITR связываются с растворимым GITR с  $K_D$  в диапазоне от  $1,2 \cdot 10^{-8}$  до  $3,5 \cdot 10^{-8}$  М. Данные представлены для 2 субклонов 3С3 с  $K_D$  в диапазоне от  $1,33 \cdot 10^{-8}$  до  $1,44 \cdot 10^{-8}$  М.

В отдельном эксперименте с использованием метода Вiasоге определяли характеристики связывания антител, имеющих вариабельные участки 28F3 с тремя разными константными участками. Первое антитело 28F3 имеет константный участок IgG1 дикого типа ("g1f", также называемый "g1", или "IgG1", или "IgG1f"; причем тяжелая цепь имеет SEQ ID NO: 17 и легкая цепь имеет SEQ ID NO: 19). Индекс "f" относится к аллотипу. Второе антитело имеет константный участок IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией, имеющий три мутации в Fc-участке ("g1.1f", также называемый "g1.1", "IgG1.1" и "IgG1.1f", содержащем L234A, L235E, G237A; причем тяжелая цепь имеет SEQ ID NO: 18 и легкая цепь имеет SEQ ID NO: 19); и третье антитело 28F3 имеет константный участок IgG1, имеющий мутацию N297A.

Эксперимент с использованием метода Вiasоге проводили, как описано выше, за исключением того, что чипы покрывали антителом к CH1 (Invitrogen, образец № 054500). Результаты, которые показаны в табл. 6, указывают на то, что все три антитела имеют подобные характеристики связывания с  $K_D$  в диапазоне от  $3,93 \times 10^{-8}$  М до  $4,39 \times 10^{-8}$  М.

Таблица 6

Кинетические характеристики 28F3, имеющего разные Fc

Образец	$k_a$ (1/М с)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	Функциональная концентрация
28F3-g1f	8,85 E+4	3,88 E-3	4,39 E-8	100%
28F3-IgG1.1	9,09 E+4	3,58 E-3	3,93 E-8	100%
28F3-N297A	7,88 E+4	3,36 E-3	4,26 E-8	100%

Пример 4. Аффинность связывания антител к GITR с активированными человеческими Т-клетками и клетками 3A9-huGITR.

Связывание антител к GITR с GITR на активированных человеческих Т-клетках и клеточной линии 3A9 мышинной Т-клеточной гибридомы, которая эктопически экспрессирует человеческий GITR (3A9-hGITR), определяли с помощью анализа по Скэтчарду. Этот анализ проводили с использованием 28F3.IgG1.1 (SEQ ID NO: 18 для тяжелой цепи и SEQ ID NO: 19 для легкой цепи) в концентрации 4,59 мг/мл.

Анализ по Скэтчарду на активированных человеческих Т-клетках проводили следующим образом. Т-клетки, полученные от человека-донора, промывали однократно средой культивирования (RPMI с 10% FBS, 2 мМ L-глутамином, пируватом натрия, 2-меркаптоэтанолом) и ресуспендировали в той же среде культивирования, дополненной 1 мкг/мл антитела к CD28 (CD28.2, BD; № 555725) и 100 Ед./мл IL-2 (Peprotech; № 200-02), в количестве  $10^6$  клеток/мл. Каждую порцию из  $5 \times 10^6$  клеток высаживали в три лунки 6-луночного планшета, которые были покрыты 20 мкг антитела к CD3 (5 мл, 4 мкг/мл, в течение ночи при 4°C; UCHT-1, BD; № 555329). Клетки инкубировали в течение 3 суток при 37°C и половину этих клеток использовали для анализа по Скэтчарду (анализ в "День 3"). Искользуванную среду от другой половины клеток заменяли на 5 мл свежей среды и клетки инкубировали еще сутки, а затем использовали для анализа по Скэтчарду (анализ в "День 4") с этими клетками.

Для анализа по Скэтчарду 28F3.IgG1.1 метили радиоактивным йодом  $^{125}\text{I-Na}$  (Perkin Elmer; № NEZ033H001MC (1mCi) с использованием реактива для твердофазного йодирования IODO-GEN® (1,3,4,6-тетрахлор-3а-ба-дифенилгликоурил; Pierce; № 28601). Избыток йодида удаляли с использованием колонки для обессоливания (Pierce; № 43243). Фракции меченного антитела собирали и анализировали в отношении радиоактивности на счетчике гамма-частиц Wizard 1470 (Perkin-Elmer). Концентрацию  $^{125}\text{I-28F3.IgG1.1}$  в каждой фракции рассчитывали с использованием флуориметра Qubit™ от Invitrogen. Чистоту радиоактивного соединения устанавливали с помощью тонкослойной хроматографии белка,

соответствующего пику, и радиоактивных фракций (Pinestar Technology; № 151-005).

Связывание меченого радиоактивным йодом 28F3.IgG1.1 с активированными человеческими Т-клетками демонстрировалось при инкубировании активированных человеческих Т-клеток с титрованием <sup>125</sup>I-28F3.IgG1.1. Неспецифическое связывание определяли по связыванию в присутствии титрования 100-кратным молярным избытком немеченого антитела и вычитали из суммарного значения СРМ для расчета специфического связывания. Линейную стандартную кривую концентрации <sup>125</sup>I-28F3.IgG1.1 относительно СРМ использовали для экстраполяции максимального количества нМ связанного <sup>125</sup>I-28F3.IgG1.1 и исходя из этого расчета количества рецепторов на клетку. Количество молекул человеческого GITR на стимулируемую человеческую CD4+Т-клетку в День 3 составляло приблизительно 8400 и в День 4 - приблизительно 13200. Результаты анализа по Скэтчарду указывают, что 28F3.IgG1.1 специфично связывается со стимулируемыми 3 суток человеческими CD4+ Т-клетками с  $K_D$ , составляющей 0,7 нМ, и стимулируемыми 4 суток человеческими CD4+ Т-клетками с  $K_D$ , составляющей 0,87 нМ.

Связывание меченого радиоактивным йодом 28F3.IgG1.1 с 3A9-huGITR клетками демонстрировалось при инкубировании 3A9-huGITR клеток с титрованием <sup>125</sup>I-28F3.IgG1.1. Неспецифическое связывание определяли по связыванию в присутствии титрования 100-кратным молярным избытком немеченого антитела и вычитали из суммарного значения СРМ для расчета специфического связывания. Линейную стандартную кривую концентрации <sup>125</sup>I-28F3.IgG1.1 относительно СРМ использовали для экстраполяции максимального количества нМ связанного <sup>125</sup>I-28F3. IgG1.1 и исходя из этого расчета количества рецепторов на клетку. Количество молекул человеческого GITR на 3A9-huGITR клетку составляло приблизительно 180000. Результаты анализа по Скэтчарду указывают на то, что 28F3.IgG1.1 специфично связывается с 3A9-huGITR клетками с  $K_D$ , составляющей 0,5 нМ.

В другом эксперименте связывание 28F3.IgG1 и 28F3.IgG1.1 с активированными CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками от человека и яванского макака. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека и яванского макака выделяли из доноров-людей и доноров-яванских макаков, и обрабатывали антителами к CD3 и антителами к CD28 для активации. Результаты указывают на то, что 28F3.IgG1 и 28.IgG1.1 аналогично связываются с активированными человеческими CD4<sup>+</sup> клетками со значениями EC50, составляющими 0,55 и 0,67 нМ соответственно, и аналогично с активированными человеческими CD8<sup>+</sup> клетками со значениями EC50, составляющими 0,56 и 0,65 нМ соответственно. 28F3.IgG1 и 28.IgG1.1 связываются с активированными CD4<sup>+</sup> клетками яванского макака со значениями EC50, составляющими 1 и 0,86 нМ соответственно, и аналогично с активированными CD8<sup>+</sup> клетками яванского макака со значениями EC50, составляющими 1,26 и 0,74 нМ соответственно.

Пример 5. Человеческие моноклональные антитела к GITR ингибируют связывание GITR-L с GITR.

Для определения того, ингибируют ли HuMab антитела к GITR связывание лиганда GITR с GITR, клетки линии 3A9 мышинной Т-клеточной гибридомы, которая эктопически экспрессирует человеческий GITR (GITR-3A9 клетки), подвергали предварительному инкубированию с mAb к GITR в концентрациях в диапазоне от 10<sup>-4</sup> до 100 мкг/мл, с последующим инкубированием с лигандом GITR (R&D Systems; №6987-GL) в концентрации 10 нг/мл. Связывание лиганда GITR на клетках определяли в анализе на основе FACS с использованием конъюгированного с PE антитела с гемагглютининовой (НА) меткой и образцы анализировали на проточном цитометре BD FACS Canto. Как показано на фиг. 34А и 34В, в этих условиях все из антител 19D3, 28F3 и GITR.3 (3C3) блокировали связывание GITR-L с GITR-3A9 клетками со значениями EC50, составляющими 0,7546, 0,2783 и 0,06934 соответственно. Аналогичные результаты получали с антителом 19H8.

Другой набор экспериментов проводили в разных условиях для дополнительной оценки степени, в которой антитела к GITR блокируют связывание GITR-L с GITR. В этих экспериментах растворимый рекомбинантный тример hGITR-L в концентрациях от 1,06 × 10<sup>-9</sup> до 100 мкг/мл добавляли к активированным человеческим Т-клеткам, и он связывался дозозависимым образом с CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками со значениями EC50, составляющими 0,016 мкг/мл (фиг. 34С). Эксперимент проводили следующим образом: рекомбинантный тример hGITR-L (R&D Systems, № 6987-GL в каталоге) в концентрации от 1,06e-9 до 100 мкг/мл добавляли к активированным РНА Т-клеткам. После 30-минутного предварительного инкубирования связанный с клетками GITR-L выявляли с использованием конъюгированного с PE антитела с НА меткой (Miltenyi, № 120-002-687 в каталоге). Образцы исследовали на проточном цитометре FACS Canto (BD, Сан-Хосе) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc, Ашленд, Орегон).

Предварительное связывание rhGITR-L в концентрациях от 1,06 × 10<sup>-9</sup> до 100 мкг/мл на активированных Т-клетках блокировало последующее связывание 0,5 мкг/мл 28F3-hIgG1 (примерно 90% от насыщения) с IC50, составляющей 0,0024 мкг/мл. Поскольку при концентрации 100 мкг/мл MFI не доходил до базового уровня (IgG контроль), ингибирование было частичным (фиг. 34D). Эксперимент проводили следующим образом: активированные РНА Т-клетки вначале обрабатывали 3-кратным титрованием рекомбинантным тримером GITR-L (R&D Systems 6987-GL) в 24 разных концентрациях, начиная со 100 мкг/мл, в течение 30 мин. Затем добавляли 28F3-hIgG1 в фиксированной концентрации, составляющей 0,5 мкг/мл, к смеси с клетками, которую подвергали инкубированию в течение еще 30 мин. Связанное с

клетками 28F3-hIgG1 выявлял с использованием конъюгированного с PE вторичного антитела к Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch, № 109-116-098 в каталоге). Неродственное Ab hIgG1 использовали в качестве изотипического контроля для 28F3-hIgG1, в то время как образец без предварительного инкубирования GITR-L включали для того, чтобы показать связывание 28F3-hIgG1 в отсутствие блокирования. Образцы исследовали на проточном цитометре FACS Canto (BD, Сан-Хосе) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc, Ашленд, Орегон).

Когда активированные Т-клетки подвергались предварительному инкубированию с 28F3-hIgG1 в концентрациях в диапазоне от  $1,06 \times 10^{-9}$  до 100 мкг/мл, воздействия на связывание GITR-L в концентрации 0,6 мкг/мл (примерно 90% от насыщения) не наблюдалось (фиг. 34E). Тем не менее, когда GITR-L добавляли в более низкой концентрации, составляющей 20 нг/мл, что близко к EC50 для него, связывание частично блокировалось предварительно связавшимся 28F3-hIgG1 с IC50, составляющей 0,076 мкг/мл (фиг. 34F). Эксперименты проводили следующим образом: активированные РНА Т-клетки подвергали предварительному инкубированию с 28F3-hIgG1 в концентрациях в диапазоне от 0,00056 до 100 мкг/мл, с последующим добавлением 0,6 мкг/мл или 20 нг/мл GITR-L. Связанный с клеткой GITR-L выявляли с использованием конъюгированного с PE антитела с НА меткой. Неродственный hIgG1 включали в качестве изотипического контроля для 28F3-hIgG1 и образец без первичного антитела использовали для того, чтобы показать связывание GITR-L без блокирования. Образцы исследовали на проточном цитометре FACS Canto (BD, Сан-Хосе) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc, Ашленд, Орегон).

Эти данные показывают, что 28F3-hIgG1 является частичным блокатором лиганда, который может обеспечивать возможность некоторого включения GITR с помощью GITR-L *in vivo*.

Пример 6. Все антитела к GITR в ходе сортировки попадают в одну группу.

Эксперименты по сортировке антител в зависимости от связываемого эпитопа проводили с использованием следующих антител к человеческому GITR: 28F3, 18E10, 19D3, 14E3, 8A6, 9G7, 3C3 и 6G10.

Антитела к GITR иммобилизовали на поверхности сенсорных чипов CM5 (Series S, GE Healthcare, № BR-1005-30 в каталоге) в проточной ячейке 2, проточной ячейке 3 и проточной ячейке 4 (5000 RU), и проточную ячейку 1 использовали в качестве отрицательного контроля. Антитела разводили до 120 мкг/мл (2X) в качестве исходной концентрации. Ряд разведений производили посредством разведения антитела буфером при соотношении концентрации 1:3 до восьми разных концентраций (120-0,0 мкг/мл, 2X) с получением кривой титрования. Каждый ряд концентраций антитела делили на две половины. В первой половине ряда концентраций 40 нМ (2X) антигена GITR (rHGITR/Fc, № 689-GR в каталоге) добавляли с получением ряда конечных концентраций (60-0,0 мкг/мл) и конечной концентрации антигена 20 нМ в каждой лунке. Во второй половине ряда концентраций вместо антигена добавляли буфер таким образом, чтоб антитело было разведено до такой же концентрации, и эту половину обрабатывали как холостую пробу. Комплексы инкубировали в течение 2 ч. 40 мкл комплексов впрыскивали на покрытую антителом поверхность со скоростью потока 30 мкл/мин. Использовали инструмент Biacore T200, и подвижный буфер представлял собой HBE-EP, GE Healthcare, №BR-1001-88 в каталоге, отфильтрованный, дегазированный, 0,01 М HEPES, pH7,4, 0,15 NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% поверхностно-активного вещества P20. Поверхность регенерировали 25 мМ NaOH (артикул: BR-1003-58, GE Healthcare) при скорости 100 мкл/мин в течение 5 с. Данные анализировали с использованием Microsoft Excel, где ряд концентраций антител откладывали на графике в зависимости от соответствующего значения в единицах ответа с получением кривых титрования.

Результаты указывают на то, что все исследуемые антитела в ходе сортировки попадают в одну группу, что говорит о том, что все они связываются с аналогичным участком во внеклеточном участке человеческого GITR.

Пример 7. Антитела к GITR связываются с конформационным эпитопом.

В этом примере показывается, что антитела к GITR 28F3 и 3C3 связываются с денатурированным человеческим GITR, а не с денатурированным человеческим GITR, и что на связывание не оказывает воздействие N- или O-связанное гликозилирование.

Связывание антител к GITR с нативным или денатурированным GITR, который имел или не имел N-связанного гликозилирования определяли следующим образом. Образцы нативного (т.е. денатурированного) и денатурированного человеческого GITR инкубировали с N-гликаназным ферментом PNGase F или без него при 37°C в PBS в течение ночи для удаления N-гликозилирования. Денатурацию GITR выполняли путем восстановления при 37°C в 50 мМ дитиотреитоле и 4 М гуанидина гидрохлориде в течение 45 мин, за чем следовало алкилирование в 100 мМ йодацетамиде в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы нативного человеческого GITR с N-связанным гликозилированием или без него подвергали электрофорезу в геле с SDS, и образцы денатурированного GITR с N-связанным гликозилированием или без него подвергали электрофорезу в геле с SDS в денатурирующих условиях. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану для вестерн-блоттинг анализа. Мембрану инкубировали с антителом 28F3. Связывание выявляли посредством инкубирования с вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP-меченное), специфичным к тяжелой и легкой цепям антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), и последующего выявления люминесценции, фикс-

сируемой на пленке. Результаты, которые показаны на фиг. 35, указывают на то, что Ab к GITR 28F3 связывается только с нативным GITR, а не с денатурированной формой, и что наличие или отсутствие гликозилирования не влияет на связывание. Аналогичные результаты получали с антителом к GITR 3C3.

Таким образом, антитела к GITR 28F3 и 3C3 связываются с эпитопом, который является конформационным и независимым от N-связанного и O-связанного гликозилирования.

Пример 8. Паттерны связывания 28F3 и 3C3 с пептидами нативного человеческого GITR.

Паттерн связывания 28F3 и 3C3 с человеческим GITR изучали посредством исследования связывания этих антител с пептидами, полученными из нативного человеческого GITR, с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинг анализа. Эксперимент проводили следующим образом. Сперва нативный человеческий GITR подвергали протеолизу посредством инкубирования с эндопротеиназой Arg-C, эндопротеиназой Lys-C, трипсином, эндопротеиназой Glu-C или эндопротеиназой Asp-N в весовом соотношении 2% при 37°C в PBS в течение 5 ч в отсутствие денатурирующих реактивов. Всю реакционную смесь, 2 мкг от каждого расщепления, затем подвергали электрофорезу в SDS-PAGE в неденатурирующих условиях и переносили на нитроцеллюлозу для вестерн-блоттинг анализа. Вестерн-блоты затем инкубировали с антителом 28F3 или 3C3 и связывание выявляли посредством инкубирования с вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP-меченное), специфичным к тяжелой и легкой цепям антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), и последующего выявления люминесценции, фиксируемой на пленке. Результаты, которые показаны на фиг. 36, указывают на то, что паттерн связывания 28F3 и 3C3 является разным, говоря о том, что эти антитела не связываются с абсолютно одинаковым участком в человеческом GITR.

Пример 9. Антитело к GITR 28F3 связывается с N-концом внеклеточного домена человеческого GITR.

Расположение участка на человеческом GITR, с которым связывается 28F3, определяли путем исследования связывания в растворе антитела с различными неденатурированными фрагментами человеческого GITR. Эксперимент проводили следующим образом: пептидные фрагменты человеческого GITR получали посредством инкубирования человеческого GITR с эндопротеиназой Arg-C, эндопротеиназой Lys-C, трипсином, эндопротеиназой Glu-C или эндопротеиназой Asp-N в весовом соотношении 2% при 37°C в PBS в течение 5 ч в отсутствие денатурирующих реактивов. Смесь пептидов затем инкубировали с гранулами с Ab к GITR в PBS при комнатной температуре в течение 2 ч. Некоторые образцы подвергали вторичному расщеплению *in situ* посредством инкубирования с отличающимся ферментом в PBS в течение 1 ч. Несвязанные пептиды удаляли путем двукратного промывания PBS гранул с Ab к GITR. Пептиды, которые связались на Ab к GITR 28F3, элюировали 2% муравьиной кислотой, а затем подвергали идентификации последовательности с помощью LC-MS. Результаты, которые представлены в виде тепловой карты на фиг. 37, указывают на то, что 28F3 связывается с конформационным эпитопом в пределах следующего N-концевого аминокислотного отрезка:

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215),

который соответствует аминокислотным остаткам 1-39 в зрелом человеческом GITR (SEQ ID NO: 4), или в пределах более короткого фрагмента

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTGDARCCRVHTTR (SEQ ID NO: 370).

Пример 10. O-Связанное гликозилирование на человеческом GITR не мешает связыванию 28F3.

O-Связанное гликозилирование на внеклеточном домене человеческого GITR неизвестно или не описано в документах. Тем не менее, остатки T18 и T20 в SEQ ID NO: 215 содержат консенсусную последовательность с O-гликозилированием. Эти остатки подчеркнуты в последовательности эпитопа:

QRPTGGPGCGPGRLLGIGTDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO: 215).

Таким образом, определяли, оказывает ли O-связанное гликозилирование влияние на связывание 28F3 с человеческим GITR.

Связывание 28F3 с гликозилированным или негликозилированным пептидом, состоящим из SEQ ID NO: 215, осуществляли следующим образом: частично гликозилированные и негликозилированные N-концевые пептиды человеческого GITR получали путем протеолиза связанного с мышинным Fc интактного внеклеточного домена нативного человеческого GITR. Негликозилированный пептид GITR, состоящий из аминокислотных остатков 1-39 в SEQ ID NO: 215, также получали с помощью органического синтеза. Процедуры связывания 28F3 с пептидами были описаны в предыдущем разделе (с использованием гранул, покрытых 28F3). Как показано на фиг. 38B, два пептида, как было обнаружено, связываются с гранулами, покрытыми 28F3, и их идентифицировали с помощью LC-MS как N-концевой пептид без O-связанного гликозилирования (фиг. 38A), а второй представлял собой такой же N-концевой пептид с O-связанным гликозилированием на T18 и/или T20 в SEQ ID NO: 215 (фиг. 38D).

Таким образом, 28F3 связывается с N-концевым участком человеческого GITR вне зависимости от того, имеет ли он O-связанный сахар на аминокислоте T18 и/или T20.

Пример 11. Связывание антитела к GITR 28F3 с последовательностью из 20 мономерных звеньев.

В рамках эксперимента, описанного в предыдущем примере, сначала осуществляли связывание синтетического пептида SEQ ID NO: 215, который не имеет никакого O-связанного гликозилирования, на гранулах, покрытых 28F3, а затем его дополнительно расщепляли посредством *in situ* расщепления эндо-

протеиназой Asp-N. Оставшийся пептид, состоящий из аминокислотной последовательности

QRPTGGPGCGPGRLLLLGIGT (SEQ ID NO: 216)

и содержащий аминокислотные остатки T18 и T20 без O-связанного гликозилирования, связывался с 28F3 (фиг. 38E). Таким образом, 28F3 связывается с последовательностью из 20 мономерных звеньев, состоящей из SEQ ID NO: 216.

Пример 12. Картирование эпитопов с помощью HDX-MS.

С помощью метода масс-спектрометрии с использованием водородно/дейтериевого обмена (HDX-MS) исследуют конформацию белка и динамику конформационных превращений в растворе посредством мониторинга скорости и степени дейтериевого обмена для атомов водорода в амидных группах остова. Уровень HDX зависит от доступности атомов водорода в амидных группах остова для растворителя, а также водородных связей в белке. Повышение массы белка при HDX можно точно измерить с помощью MS. Когда эту методику применяют в паре с ферментативным расщеплением, можно выяснить структурные особенности на уровне пептида, создавая возможность для разграничения обращенных к поверхности пептидов и пептидов, свернутых внутрь. Как правило, проводят эксперименты с мечением дейтерием и последующим гашением, за которым следуют расщепление пепсином, разделение пептидов и MS-анализ в реальном масштабе времени.

Перед картированием эпитопов для mAb 28F3.IgG1 (имеющем тяжелую и легкую цепи, состоящие из SEQ ID NO: 17 и 19 соответственно) в GITR с помощью HDX-MS проводили эксперименты без дейтерирования для получения перечня пептидов, обычно получаемых в результате расщепления, для рекомбинантного человеческого GITR/Fc (R&D systems, 10 мкМ, который содержит аминокислотную замену T20A) и белкового комплекса рекомбинантного человеческого GITR/Fc и mAb 28F3.IgG1 (молярное отношение 1:2, 10 и 20 мкМ), обеспечивающего 86% охват последовательности для N-концевого участка GITR (фиг. 39A). В этом эксперименте 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,0) использовали на этапе мечения с последующим добавлением гасящего буфера (200 мМ фосфатный буфер с 4 М GdnCl и 0,5 М TCEP, pH 2,5, 1:1 об./об.). Для экспериментов по картированию эпитопов 5 мкл каждого образца (GITR/Fc или GITR/Fc с mAb 28F3.IgG1 (молярное отношение 1:2)) разводили в 55 мкл буфера с D<sub>2</sub>O (10 мМ фосфатный буфер, D<sub>2</sub>O, pH 7,0) для того, чтобы начать реакции мечения при комнатной температуре. Реакции осуществляли в течение разных периодов времени: 20 с, 1, 10, 60 и 240 мин. По окончании периода каждой реакции мечения реакцию гасили добавлением гасящего буфера (1:1 об./об.) и 50 мкл гашеного образца впрыскивали в систему Waters HDX-MS для анализа. Наблюдаемые пептиды, обычно получаемые в результате расщепления, подвергали мониторингу в отношении их уровней поглощения дейтерия в отсутствие/в присутствии mAb 28F3.IgG1.

Экспериментальные данные, показанные на фиг. 39B и 39C, полученные в результате измерений HDX-MS на mAb 28F3.IgG1 в GITR, указывают на то, что mAb 28F3.IgG1 имеет прерывающийся эпитоп, состоящий из (или имеющий в своем составе) двух пептидных участков в N-концевом участке GITR:

Пептидный участок 1: PTGGPGCGPGRLLLLGTGA (SEQ ID NO: 217).

Пептидный участок 2: CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218).

Исходя из изменений относительных уровней поглощения дейтерия два пептидных участка можно расположить по рангу как участок 1 > 2, причем участок 1 характеризуется наиболее значительными изменениями поглощения дейтерия, и при этом отличие для участка 2 является статистически значимым.

Пример 13. Антитела к GITR индуцируют секрецию IL-2 и IFN- $\gamma$  из Т-клеток.

Антитела к GITR исследовали в отношении их способности усиливать активность Т-клеток *in vitro* посредством измерения количества IL-2 и IFN- $\gamma$ , секретлируемых Т-клетками, которые инкубировали с антителами.

Клетки линии 3A9 мышинной Т-клеточной гибридомы, которая эктопически экспрессирует человеческий GITR (3A9-hGITR), культивировали на планшетах, покрытых моноклональным антителом к CD3, в присутствии возрастающих количеств антител 19D3, 18E10 и 28F3.  $5 \times 10^4$  3A9-hGITR клеток культивировали на планшетах, покрытых 1 мкг/мл антитела к CD3 (клон 145-2C11; BD Biosciences), и обрабатывали идентичными концентрациями антител в течение 24 ч. Как показано на фиг. 40, все из антител 3C3 (GITR.3), 28F3, 19D3 и 18E10 усиливали секрецию IL-2 из Т-клеток дозозависимым образом. Как ожидалось, контрольные антитела hIgG1 и hIgG2 не повышали секрецию IL-2 из 3A9-hGITR клеток.

С учетом того, что антитела к GITR усиливали секрецию IL-2 из 3A9-hGITR клеток в присутствии стимулирующего сигнала от CD3, исследовали способность антител усиливать секрецию IL-2 из 3A9-hGITR клеток, активированных специфичным антигеном.  $5 \times 10^4$  3A9-hGITR клеток культивировали совместно с  $2,5 \times 10^4$  антигенпрезентирующих клеток LK35.2 в присутствии 0,4 мкМ пептида HEL48-63 и указанных антител в течение 24 ч. Как показано на фиг. 41A и 41B, антитела 18E10, 13H2 (такое же антитело, что и 28F3), 28F3, 3C3 и 19D3 усиливали секрецию IL-2 из 3A9-hGITR клеток дозозависимым образом.

В дальнейших экспериментах эффект 28F3 в отношении секреции IL-2 и IFN- $\gamma$  Т-клетками исследовали на Т-клетках донора-человека, которые стимулировали CHO клетками, экспрессирующими scFv к CD3 (ОКТ3). CHO клетки экспрессировали низкие уровни ОКТ3 для содействия субоптимальной стиму-

ляции, чтобы было возможно наблюдать агонизм со стороны антител к GITR. В одном наборе экспериментов CD3+ Т-клетки от донора стимулировали CHO клетками, экспрессирующими ОКТ3, и антителом к GITR и измеряли секрецию IFN- $\gamma$ , и во втором наборе экспериментов CD4+ Т-клетки от 2 доноров (отличающихся от донора CD3+ Т-клеток) стимулировали CHO клетками, экспрессирующими ОКТ3, и антителом к GITR и измеряли секрецию IL-2 и IFN- $\gamma$ . Эксперименты проводили следующим образом. Общие Т-клетки получали из человеческих PBMC, выделенных в градиенте плотности фиколла (Amersham Bioscience 17-1440-03) с использованием набора для выделения общих Т-клеток (Miltenyi; № 130-091-156) в соответствии с протоколом производителя. В случае экспериментов с CD4+ Т-клетками CD4+Т-клетки получали из человеческих PBMC (доноры 1 и 2) с использованием коктейля для обогащения человеческих CD4+ Т-клеток RosetteSep (StemCell Technology; № 15062) в соответствии с протоколом производителя. CHO клетки, экспрессирующие scFv к CD3 (ОКТ3), (CHO-ОКТ3) дважды промывали средой RPMI и подвергали облучению дозой 50 тысяч Рад. Клетки собирали и ресуспендировали в среде культивирования (RPMI-1640, дополненная 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамином, 55 нМ  $\beta$ -меркаптоэтанолом, 1 mM пируватом натрия и 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина) в концентрации  $2,5 \times 10^5$ /мл. Высевали  $2,5 \times 10^4$  CHO-ОКТ3 клеток и  $1 \times 10^5$  Т-клеток на лунку в 96-луночном плоскодонном планшете, относящемся к классу, подходящему для тканевой культуры (TC) (Costar). Клетки инкубировали с 3-кратным титрованием антителом к GITR в 8 разных концентрациях, начиная с 20 мкг/мл. Неродственный hIgG1 добавляли в концентрации 20 мкг/мл в качестве изотипического контроля. Образец, содержащий только клетки, включали для того, чтобы показать фоновую активность без какой-либо обработки. Супернатант из каждого образца собирали в День 2 для измерения уровня IL-2 (только для анализов с использованием CD4+ Т-клеток) (набор BD opt EIA Human IL-2 ELISA kit; BD Bioscience; № 555190) и в День 3 для измерения IFN- $\gamma$  (набор BD optEIA human IFN-g ELISA Kit; BD Bioscience; № 555142).

Результаты, которые показаны на фиг. 42В-Е, указывают на дозозависимое повышение 28F3 секреции IL-2 и IFN- $\gamma$  CD4+ Т-клетками от обоих доноров.

Также демонстрировалась секреция IFN- $\gamma$  донорскими Т-клетками, стимулируемыми другими антителами к GITR. Анализ проводили, как описано выше. Как показано на фиг. 42А, все из антител 28F3, 3С3, 19D3 и 18E10 усиливали секрецию IFN- $\gamma$  из CD3+ Т-клеток дозозависимым образом, причем антитела 28F3 и 3С3 проявляют наибольший эффект из исследуемых антител.

В другом эксперименте пролиферацию Т-клеток в присутствии антител к GITR, в частности 28F3, наблюдали при реакциях смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

В совокупности, эти данные указывают на то, что антитела 18E10, 19D3 и 28F3 функционируют как агонистические антитела к GITR, которые усиливают секрецию цитокинов из Т-клеток.

Пример 14. Антитела к GITR активируют Т-клеточные реакции независимо от взаимодействия с FcR *in vitro*.

Сообщалось, что агонистические антитела к TNFR требуют совместного включения Fc $\gamma$ RIIB для своей активности *in vivo* (Li et al., Cell Cycle 2012; 11:3343-3344). Для определения того, распространяется ли это требование также и на антитела к GITR, 3A9-hGITR клетки подвергали совместному культивированию с LK35.2 клетками и пептидом HEL48-63, как описано в примере 13, обрабатывали полноразмерным антителом к GITR 28F3 (hIgG2), F(ab')2 фрагментом 28F3 или Fab фрагментом 28F3 и оценивали в отношении продукции mIL-2. Результаты, которые изложены на фиг. 43, показали, что как полноразмерный 28F3, так и F(ab')2 фрагмент 28F3 усиливали продукцию mIL-2, тогда как Fab фрагмент 28F3 проявлял более слабый эффект, это говорит о том, что включение бивалентной, а не моновалентной молекулой способствует эффекту антитела к GITR 28F3. Эти результаты в совокупности говорят о том, что несмотря на то, что совместное включение Fc $\gamma$ RIIB не требуется для активирующих Т-клетки эффектов агонистических антител к GITR *in vitro*, включение Fc $\gamma$ RIIB рецептора может усиливать агонистическую активность. Антитела к GITR могут быть сконструированы с повышением связывания с Fc $\gamma$ RIIB рецептором для повышения их агонизма.

Пример 15. Антитело к GITR 28F3 метит лимфоциты в миндалинах человека.

С целью определения того, в каких ткани экспрессируется GITR, антитело к GITR 28F3 использовали для иммуногистохимического выявления GITR в различных тканях. Не было обнаружено специфического окрашивания в тканях помимо лимфоидной (в том числе в сердце, печени, легком, почке, коже, периферическом нерве, щитовидной железе, яичке, предстательной железе). Положительное окрашивание наблюдалось только в рассеянных субпопуляциях лимфоцитов и/или мононуклеарных клеток в лимфоидной ткани (в том числе миндалина, селезенка и тимус) и в тканях, богатых лимфоидными клетками (собственная пластинка слизистой оболочки толстой кишки, желудка, матки). Окрашивание в миндалинах показано на фиг. 44. Положительное окрашивание наблюдали в рассеянных лимфоцитах во внутреннем/парафолликулярном участке и герминативном центре. Рассеянные кластеры мононуклеарных клеток (под эпителием) и инфильтрирующие в эпителий лимфоциты также окрашивались положительно.

Пример 16. Противоопухолевая активность вариантов изотипов антитела к GITR в модели опухоли MC38.

DTA-1 представляет собой агонистическое крысиное антитело к мышинному GITR (Shimizu et al., 2002; eBioscience, San Diego, CA). Это антитело IgG2b, как было показано, модулирует как  $T_{reg}$  и  $T_{eff}$  во время лечения B16 меланомы. Кроме того, экспрессия GITR и  $T_{eff}$ , и  $T_{reg}$  была необходима для полных эффектов DTA-1. В Cohen et al. (2010) сообщается о том, что, несмотря на то что лигирование GITR DTA-1, в целом, не нарушает супрессорную активность  $T_{reg}$ , оно ослабляет инфильтрацию  $T_{reg}$  в опухоль и ведет к потере экспрессии Foxp3 во внутриопухолевых  $T_{reg}$ , что влечет за собой локализованное нарушение супрессии. Конечным результатом является увеличенное соотношение внутриопухолевых  $T_{eff}$ : $T_{reg}$  и более сильная активация и функционирование  $T_{eff}$  внутри опухоли. DTA-1 блокирует взаимодействие между GITR и лигандом GITR (GITRL), и растворимое антитело является эффективным в стимуляции клеточной реакции *in vitro*. Оно также является эффективным в различных моделях опухолей при ингибировании роста опухоли (см., например, Turk et al., 2004; Cohen et al., 2010).

а) Эксперимент № 1 с MC38.

Противоопухолевую активность разных изотипов антитела к GITR (DTA-1) оценивали в стадийной модели опухоли аденокарциномы толстой кишки MC38. Каждой из C57BL/6 мышей вводили инъекцией подкожно  $2 \times 10^6$  опухолевых клеток MC38. Через 7 суток мышей рандомизировали на 5 групп обработки и исследуемые антитела вводили IP в Дни 7, 10 и 14 в количестве 200 мкг на дозу в объеме 200 мкл следующим образом: группа 1: контрольный мышинный IgG1 (IgG); группа 2: крысиное Ab к GITR IgG2b (DTA-rG2b); группа 3: мышинное Ab к GITR IgG1 (DTA-mG1); и группа 4: мышинное Ab к GITR IgG 2a (DTA-mG2a). Опухоли и селезенки собирали в День 15.

На фиг. 45С показано, что обработанные антителом к GITR IgG1 опухоли росли со скоростью, сравнимой с опухолями, обработанными контрольным мышинным IgG1 (фиг. 45А), ни у одной из 10 мышей не было отмечено отсутствия опухоли (TF) к окончанию мониторинга мышей. Тем не менее, DTA-rG2b (фиг. 45В) и DTA-mG2a (фиг. 45D) значительно снижали скорость роста опухоли, причем 3 и 2 из 10 мышей соответственно были TF.

Изменения средних объемов опухолей и медианных объемов опухолей у мышей в группах, обработанных разными изотипами антитела к GITR, представлены в виде графика на фиг. 46А и 46В. Эти графики подтверждают данные от отдельных мышей, показанные на фиг. 45, о том, что изотип IgG2b антитела к GITR проявляет наиболее сильный ингибирующий эффект в отношении роста опухоли MC38, причем изотип IgG2a является лишь чуть менее активным. Изотип IgG1 проявляет незначительное ингибирование роста опухоли, причем средние и медианные объемы опухолей были аналогичными таковым у мышей, обработанных контрольным мышинным IgG

Также определяли эффекты изотипов антитела к GITR в отношении Т-клеточных субпопуляций MC38 среди TIL и в селезенке. Сравнивали популяции в составе Т-клеточных субпопуляций среди TIL MC38 и в селезенках от мышей, обработанных разными изотипами антитела к GITR. В селезенке DTA-m2a и DTA-r2b вызывали незначительное снижение уровня  $CD8^+$  клеток, тогда как 9D9-m2a (антитело к CTLA-4) и DTA-m1 не изменяли уровень  $CD8^+$  Т-клеток (фиг. 47А). Ни один из исследуемых вариантов изотипов не оказывал значительного эффекта в отношении процента  $CD4^+$  или  $CD4^+Foxp3^+$  клеток в селезенке (фиг. 47В и 47С).

Среди TIL 9D9-m2a вызывало по меньшей мере 2-кратное повышение процента  $CD8^+$  клеток по сравнению с контрольным мышинным IgG1 (фиг. 47D). DTA-m2a оказывал менее выраженный эффект, повышая процент  $CD8^+$  клеток приблизительно на 50%, тогда как DTA-m1 и DTA-r2b не вызывало никакого повышения или вызывало лишь незначительное повышение процента  $CD8^+$  клеток по сравнению с изотипическим контролем в виде мышинного IgG1 (фиг. 47D). 9D9-m2a вызывало незначительное повышение процента  $CD4^+$  клеток по сравнению с изотипическим контролем в виде мышинного IgG1, тогда как DTA-m1 не вызывало изменения у  $CD4^+$  (фиг. 47Е). В отличие от этого, как DTA-m2a, так и DTA-r2b снижали процент  $CD4^+$  на 40-50% по сравнению с мышинным изотипом IgG1 (фиг. 47Е).

Наиболее значительные эффекты наблюдали в отношении уровней  $CD4^+Foxp3^+ T_{reg}$  среди TIL. В то время как DTA-m1 не оказывало эффект в отношении этой популяции Т-клеток, 9D9-m2a и DTA-m2a индуцировали примерно 6-кратное снижение уровня  $CD4^+Foxp3^+ T_{reg}$  по сравнению с изотипом IgG1 и DTA-m1 (фиг. 47F). Эти данные демонстрируют, что вариант IgG2a антитела к GITR снижает уровень  $T_{reg}$  конкретно в опухолевом окружении. Таким образом, изотип IgG2a антитела к GITR индуцирует повышение уровня  $CD8^+ T_{eff}$  и снижение уровня  $T_{reg}$  в сайте опухоли, что обуславливает повышенное соотношение  $T_{eff}$  к  $T_{reg}$ , которое является показателем сильной противоопухолевой активности. DTA-r2b также индуцировало значительное снижение уровня  $CD4^+Foxp3^+ T_{reg}$  по сравнению с контрольным IgG1, хотя это снижение было не столь выраженным, как индуцируемое 9D9-m2a и DTA-m2a, что согласуется с более низким связыванием Fc-участка крысиного IgG2b с мышинными активирующими FcγR. Эти данные демонстрируют, что агонистическое антитело к GITR требует включения активирующих FcγR для активности, заключающейся в сокращении количества.

Проточно-цитометрическое измерение уровня экспрессии GITR в разных субпопуляциях Т-клеток среди TIL в MC38 и в селезенке показало, что уровень экспрессии GITR был наиболее высоким на  $T_{reg}$  в

сайте опухоли, причем в данном случае уровень экспрессии был выше, чем на  $T_{reg}$  на периферии или  $CD8^+ T_{eff}$  в сайте опухоли, в котором, в свою очередь, проявлялась более высокая экспрессия, чем на  $CD8^+$  или  $CD4^+ T_{eff}$  на периферии. Наиболее низкий относительный уровень экспрессии GITR наблюдали на  $CD4^+ T_{eff}$  в сайте опухоли. Эти данные подсказывают механизм, на основании которого активность, заключающаяся в сокращении количества Т-клеток, содействует стимуляции Т-клеточной реакции и тем самым повышает противоопухолевую эффективность Fc-слитого белка, если мишень Fc-слитого белка характеризуется высоким уровнем экспрессии на  $T_{reg}$  в сайте опухоли в сравнении с экспрессией мишени на  $T_{eff}$  в сайте опухоли, и Fc-слитый белок связывается с активирующим FcR, который опосредует сокращение количества клеток-мишеней.

б) Эксперимент № 2 с MC38.

Вследствие агрегации, с которой сталкивались в случае вариантов DTA-1 (за исключением коммерчески полученной исходной формы DTA-r2b), новый набор изотипических вариантов подвергали повторному конструированию с получением антител DTA-1, которые не агрегируют. Наблюдаемая агрегация являлась следствием дополнительной аминокислоты, которая была по невнимательности включена в легкую цепь сконструированных изотипических вариантов, и проблему сняли путем удаления этой излишней аминокислоты. Подвергшиеся повторному конструированию антитела использовали в этом эксперименте № 2. Противоопухолевую активность подвергшихся повторному конструированию изотипов антитела к GITR (DTA-1; серия GITR.7) оценивали с использованием стадийной модели MC38. Каждой из C57BL/6 мышей имплантировали подкожно  $2 \times 10^6$  клеток MC38. Через 7 дней мышей рандомизировали на 7 групп обработки таким образом, чтобы они имели сравнимые средние объемы опухоли, составляющие  $148 \text{ мм}^3/2$ , и исследуемые антитела вводили IP в Дни 7, 10 и 14 в количестве 200 мкг на дозу (за исключением контрольного mIgG, который вводили в дозе 200 мкг) следующим образом: группа 1: контрольный мышиный IgG1 (mIgG или "изотип"); группа 2: мышиное Ab IgG1 к GITR (mGITR.7.mg1); группа 3: мышиный изотип IgG1D265A антитела к GITR (mGITR.7.mg1-D265A); группа 4: мышиное Ab IgG2a к GITR (mGITR.7.mg2a); группа 5: мышиное Ab IgG2b к GITR (mGITR.7.mg2b); и группа 6: крысиное Ab IgG2b к GITR (mGITR.7.r2b или DTA-1-rG2b). Опухоли и селезенки собирали в День 15.

На фиг. 48B и 48C показано, что обработанные антителом к GITR IgG1 и IgG1-D265A опухоли росли со скоростью, сравнимой с опухолями, обработанными контрольным мышиным IgG1 (фиг. 48A). В каждом случае ни одна из 9 мышей не была TF к окончанию мониторинга мышей через 35 суток после имплантации. Тем не менее, аналогично результатам в эксперименте № 1 с MC38, mGITR.7.mg2a (фиг. 48D) индуцировало наибольшее ингибирование роста опухоли, причем 2 из 9 мышей были TF. Мышиное и крысиное антитела-2b к GITR также значительно снижали скорость роста опухоли в подобной степени (фиг. 48E и 48F), хотя крысиное антитело 2b давало 1 TF мышь, тогда как мышиное антитело 2b не давало никаких TF мышей через 35 суток после имплантации.

Изменения средних объемов опухолей и медианных объемов опухолей показаны на фиг. 49A и 49B. Тенденции являются аналогичными наблюдаемым в эксперименте № 1 с MC38, за исключением того, что изотип IgG2a антитела к GITR был наиболее сильным ингибитором роста опухоли MC38, тогда как изотип IgG2b проявлял значительную, но более низкую активность в ингибировании роста опухоли. Изотипы IgG1 и IgG1-D265A показывали низкий уровень ингибирования роста опухоли по сравнению с контрольным мышиным IgG.

Эффекты разных изотипов антитела к GITR в отношении популяций  $T_{reg}$  среди TIL и в селезенке из обработанных мышей показаны на фиг. 50. Как наблюдали в эксперименте № 1, ни один из исследуемых вариантов изотипов не оказывал значительного эффекта в отношении процента  $CD4^+Foxp3^+$  Treg в селезенке: наиболее сильным эффектом было повышение менее чем на 40%, индуцированное обработкой изотипом IgG2b крысиного антитела к GITR, тогда как изотип IgG2b мышиного антитела к GITR незначительно снижал процент  $CD4^+Foxp3^+$  Treg. Другие исследуемые изотипы антитела к GITR и антитело IgG2a к CTLA-4 (9D9-mG2a) незначительно повышали процент Treg (фиг. 50A).

В противоположность, среди TIL, за исключением изотипа IgG1, который не вызывал никакого изменения по сравнению с изотипическим контролем, все из исследуемых антител индуцировали значительные снижения процента Treg. Антитело к CTLA-4 9D9-mG2a вызывало примерно 4-кратное снижение уровня  $CD4^+Foxp3^+$  Treg по сравнению с изотипом IgG1; все из изотипов 2a и 2b мышиного антитела к GITR и изотипа 2b крысиного антитела снижали уровень Treg приблизительно 2-кратно, а мутант IgG1-D265A вызывал немного меньшее снижение (фиг. 50B). Эти данные подтверждают эффекты, наблюдаемые в эксперименте № 1 в плане демонстрации того, что изотипы mG2a, mG2b и rG2b антитела к GITR индуцируют значительное сокращение количества Treg в опухолевом окружении, которое коррелирует с ингибированием роста опухоли.

Данные, полученные в эксперименте № 2 с MC38 преимущественно согласуются с данными, полученными в эксперименте № 1, это говорит о том, что агрегация антител не создает излишних препятствий для активностей антител. Возможно, агрегированные антитела быстро промывались у мышей, и, следовательно, агрегация антител может не являться существенной проблемой в данных анализах *in vivo*.

Пример 17. Противоопухолевая активность вариантов изоформ антитела к GITR в стадийной модели опухоли Sa1N.

Противоопухолевую активность антитела к GITR также оценивали в модели саркомы Sa1N у A/J мышей. Мышам вводили инъекцией подкожно  $2 \times 10^6$  Sa1N клеток на имплантат. Через 7 суток определяли объемы опухолей и мышей рандомизировали на группы обработки таким образом, чтобы они имели сравнимые средние объемы опухолей (приблизительно  $75 \text{ мм}^3/2$ ). Антитела к GITR (DTA-1), сконструированные таким образом, чтобы они относились к разным изоформам, как описано в примере 10, эксперименте № 1 с MC38, вводили IP в Дни 7, 10 и 12 в количестве 200 мкг на дозу.

Эффекты в отношении роста опухоли показаны на фиг. 51. Обработка антителом IgG2a к GITR полностью ингибировала рост опухоли, и все 10 мышей были TF приблизительно ко Дню 20 после имплантации (фиг. 51B), и крысиный изоформ IgG2b оказывал аналогичный эффект, причем 9 из 10 мышей были TF приблизительно ко Дню 20 (фиг. 51C). Изоформы IgG1 (фиг. 51D) и IgG1D265A (фиг. 51E) ингибировали опухоль в некоторой степени по сравнению с неингибируемым ростом у опухолей, обработанных изотипическим контролем IgG1 (фиг. 51A), но это ингибирование было гораздо меньшим, чем ингибирование, наблюдаемое с изоформами mIgG2a и rIgG2b. Изменения средних объемов опухолей и медианных объемов опухолей, показанные на фиг. 52A и 52B, подтверждают практически полностью ингибирующий эффект антител mIgG2a и rIgG2b в отношении роста опухоли по сравнению с гораздо более низким ингибированием роста опухоли, проявляемым изоформами mIgG1 и mIgG1-D265A.

В совокупности, данные на фиг. 51 и 52 подтверждают данные, которые получены с моделью опухоли MC38 (пример 10), показывающие, что изоформы mIgG2a и rIgG2b антитела к GITR проявляют сильную противоопухолевую активность, в отличие от изоформ mIgG1 (и mIgG1-D265A), которые проявляют гораздо более низкую противоопухолевую активность. Противоопухолевая активность вариантов антител mIgG1 и D265A в модели Sa1N соответствует эффектам агонизма GITR без сокращения количества  $T_{\text{reg}}$ .

Эффекты разных изоформ антитела к GITR в отношении популяций  $T_{\text{reg}}$  среди TIL в Sa1N и в селезенке из обработанных мышей показаны на фиг. 53. Все из исследуемых вариантов изоформ антитела к GITR индуцировали сравнительно небольшие повышения уровня  $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$   $T_{\text{reg}}$  в селезенке приблизительно на 20-40%. Наибольшее повышение индуцировалось обработкой изоформом IgG2a мышинового антитела к GITR, которая вызывала такое же повышение, что и обработка антителами IgG2b (9D9-G2b) и IgG1-D265A (9D9-G1-D265A) к CTLA-4 (фиг. 53A). Последние изоформы антител к CTLA-4 использовали в качестве положительных контролей в данном исследовании GITR, поскольку сокращение количества  $T_{\text{reg}}$  ранее наблюдалось с изоформом IgG2b.

В отличие от эффекта  $T_{\text{reg}}$  на периферии, все изоформы m2a и m2b антитела к GITR, а также изоформы 2b антитела к CTLA-4 снижали уровень  $T_{\text{reg}}$  в сайте опухоли по меньшей мере 3,5-кратно (фиг. 53B). Как изоформ IgG1 антитела к GITR, так и мутант IgG1-D265A индуцировали меньшие снижения, приблизительно на 35%, процента  $T_{\text{reg}}$ , тогда как мутантное антитело IgG1-D265A к CTLA-4 не вызывало изменения процента  $T_{\text{reg}}$  среди TIL (фиг. 53B). Таким образом, как наблюдалось в модели опухоли MC38, изоформы mG2a и rG2b антитела к GITR индуцируют значительное сокращение количества  $T_{\text{reg}}$  в опухолевом окружении, намного большее, чем антитела IgG1 и IgG1-D265A, которое коррелирует с ингибированием роста опухоли.

Пример 18. Синергичная активность с комбинацией антитела к GITR и антагонистического антитела к PD1.

С целью определения того, можно ли получить синергичный противоопухолевый эффект путем объединения антитела DTA-1 с антителом, которое является антагонистичным по отношению к PD-1 молекуле, которая обеспечивает ингибирующий сигнал для противоопухолевых механизмов, оценивали эффект комбинации антител в отношении объема опухоли с использованием стадийной модели аденокарциномы толстой кишки MC38. Мышей обрабатывали (A) контрольным mIgG1, (B) mIgG + DTA-1, (C) mIgG + PD-1 (клон 4H2, BMS) и (D) PD-1 + DTA-1 в Дни 7, 10 и 14.

Эффекты в отношении роста опухоли показаны на фиг. 54. Обработка антителом DTA-1 или антителом к PD-1 по отдельности ингибировала рост опухоли в определенной степени, причем в каждом случае 2 из 10 мышей были TF. В противоположность, комбинация антитела DTA-1 и антитела к PD-1 значительно повышала число TF мышей ко Дню 30, причем 7 из 10 мышей были TF. Как ожидалось, среди мышей, которым вводили контрольный mIgG, не было TF мышей.

Эти результаты говорят о том, что комбинация агонистических антител к GITR и антагонистических антител к PD-1 действует синергично, ингибируя рост опухоли.

Пример 19. Эффект аминокислотных мутаций в CDR в отношении аффинности связывания.

В данном примере показано, что определенные аминокислотные остатки в CDR3  $V_H$  в 28F3 можно подвергнуть мутации в другую аминокислоту без существенного влияния на аффинность связывания.

Получали 48 мутантов 28F3 посредством осуществления мутаций одной или нескольких из следующих аминокислот в CDR3  $V_H$ : M102, D106 и M111 (нумерация соответствует SEQ ID NO: 13) и исследовали следующие активности: связывание с 3A9-hGITR клетками и секреция IL-2 3A9-hGITR клетками в присутствии связанного с планшетом антитела к CD3. Эксперименты проводили, как описано

выше.

Результаты показаны на фиг. 55A и 55B (связывание с 3A9-hGITR клетками), фиг. 56A-F (секреция IL-2) и в табл. 7.

Таблица 7

Эффекты аминокислотных мутаций в CDR в отношении аффинности связывания

Обозначения на фиг. 55 и 56	Мутация(мутации)	EC50 для активности антитела в 3A9 клетках	EC50 для связывание антитела, измеренная с помощью FACS
A1	M98V, M111L	1,731	0,5297
B1	M98F, M111L		7,762
C1	M98L, M111L	0,674	0,101
D1	M98I, M111L	0,218	0,155
E1	M98Q, M111L	3,274	3,259
F1	M98S, M111L		9,037
G1	M98A, M111L		28,02
H1	M98Y, M111L		92,92
A2	M98V, M111F	1,338	0,5543
B2	M98F, M111F		~399,9
C2	M98L, M111F		0,2066
D2	M98I, M111F	0,1326	0,1999
E2	M98Q, M111F		2,489
F2	M98S, M111F		36,81
G2	M98A, M111F		25,59
H2	M98Y, M111F		36,83
A3	M98V, D106E, M111L	0,7144	0,4297
B3	M98F, D106E, M111L		62,56
C3	M98L, D106E, M111L	1,037	0,1824
D3	M98I, D106E, M111L	0,0883	0,1602
E3	M98Q, D106E, M111L		3,054
F3	M98S, D106E, M111L		~187,0
G3	M98A, D106E, M111L		9,292
H3	M98Y, D106E, M111L		27,37
A4	M98V, D106E, M111F		0,1157
B4	M98F, D106E, M111F		8,097
C4	M98L, D106E, M111F	0,2618	0,09559
D4	M98Q, D106E, M111F	0,4539	0,4984
E4	M98S, D106E, M111F		~5,77e+006
F4	M98A, D106E, M111F	0,2613	2,86
G4	M98Y, D106E, M111F		6,752
H4	M98V, D106E	0,01499	0,08696
A5	M98F, D106E		0,1024
B5	M98L, D106E	0,02552	0,04658
C5	M98I, D106E	0,02048	0,05227
D5	M98Q, D106E	0,04963	0,1451
E5	M98S, D106E	1,01	0,3437
F5	M98A, D106E	0,06304	0,06008
G5	M98Y, D106E	1,081	0,1196
H5	M98V	0,05336	0,05104
A6	M98F		0,1194
B6	M98L	0,1104	0,1136
C6	M98I	0,1104	0,2126
D6	M98Q	0,08124	0,2155
E6	M98S	0,1226	0,526
F6	M98A	3,491	0,225
G6	M98Y		0,252
H6	Не подвергшийся мутации 28F3	0,0418	0,05002

Результаты указывают на то, что несколько мутантов характеризуются связыванием и активностью, сравнимыми с 28F3, тогда как другие мутации снижают одно из связывания и секреции IL-2 или как связывание, так и секрецию IL-2. Следующие мутанты характеризовались сравнимыми данными связывания и активности: M98V; M98V/D106E; M98L/D106E; M98I/D106E и M98A/D106E.

Пример 20. Эффекты модификаций константного участка в отношении агонистической активности антитела к GITR.

В этом примере демонстрируется, что антитела к GITR, содержащие шарнир IgG2, характеризуются повышенной способностью индуцировать секрецию IL-2 и IFN- $\gamma$  из Т-клеток в сравнении с такими же

антителами, которые имеют шарнир IgG1.

В вышеописанных анализах с CHO-ОКТ3 и 3А9 клетками наблюдали, что полученные из гибридо-мы антитела, имеющие константный участок IgG2, являются более активными в стимуляции секреции цитокинов, чем такие же антитела, в которых константный участок тяжелой цепи был "переключен" на таковой из IgG1 или из IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией (IgG1.1). Таким образом, в данных анализах эффект константного участка или шарнира IgG2 дополнительно исследовали на антителах к GITR.

Вариабельный участок тяжелой цепи антитела к человеческому GITR связывали со следующими константными участками тяжелой цепи.

Таблица 8

Конфигурации константного участка в приведенных в качестве примера антителах к GITR

Название антитела	СН1	Шарнир	СН2	СН3	SEQ ID NO*
Антитело к GITR	IgG2 SEQ ID NO:279	IgG2 SEQ ID NO:291	IgG2 SEQ ID NO:297	IgG2 SEQ ID NO:298	SEQ ID NO:221
Антитело к GITR - IgG2	IgG2 SEQ ID NO:279	IgG2 SEQ ID NO:291	IgG2 SEQ ID NO:297	IgG2 SEQ ID NO:298	SEQ ID NO:221
Антитело к GITR - IgG1	IgG1 SEQ ID NO:278	IgG1 SEQ ID NO:295	IgG1 SEQ ID NO:280	IgG1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:7
Антитело к GITR - IgG1.1	IgG1.1 SEQ ID NO:278	IgG1.1 (L234A/L235E/G237A) SEQ ID NO:296	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:281	IgG1.1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:11
Антитело к GITR - IgG2-IgG1 или антитело к GITR.g2.g1	IgG2 SEQ ID NO:279	Гибрид IgG2/IgG1 SEQ ID NO:293	IgG1 SEQ ID NO:280	IgG1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:223
Антитело к GITR - IgG2-IgG1.1 или антитело к GITR.g2.g1.1	IgG2 SEQ ID NO:279	IgG2 SEQ ID NO:291	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:281	IgG1 SEQ ID NO:282	SEQ ID NO:224

Вначале аффинности связывания у этих антител к GITR сравнивали с аффинностями связывания у антител к GITR, имеющих шарнир IgG1. Аффинности связывания определяли, как описано в примере 2. Как показано на фиг. 57, все три антитела к GITR, имеющие шарнир IgG2, характеризовались аналогичными аффинностями в отношении активированных Т-клеток, что и два антитела к GITR, имеющие шарнир IgG1.

Затем антитела к GITR, имеющие константный участок IgG1 или шарнир IgG2/ Fc-домен IgG1 исследовали в отношении их способности индуцировать секрецию IL-2 и IFN- $\gamma$  из Т-клеток, стимулируемых CHO клетками, экспрессирующими ОКТ3, как описано в примере 13. Как показано на фиг. 58А и 58В, антитело с шарниром IgG2/Fc-доменом IgG1 ("anti-GITR.G2.g1f") индуцировало секрецию как IFN- $\gamma$ , так и IL-2 из Т-клеток в большей степени, чем антитело с константным участком IgG1 ("anti-GITR.g1f"). Аналогичные результаты получали с вариантами этих константных доменов с отсутствующей эффекторной функцией (фиг. 58С).

Чтобы дополнительно подтвердить повышенную активацию Т-клеток антителами к GITR, содержащими шарнир IgG2, исследовали секрецию IL-2 в разных форматах эксперимента. В этом эксперименте способность антител к GITR индуцировать секрецию IL-2 из 3А9-hGITR клеток (клеточная линия 3А9 мышинной Т-клеточной гибридомы, эктопически экспрессирующая человеческий GITR) исследовали, как описано в примере 13. Как показано на фиг. 59, все антитела, имеющие шарнир IgG2 ("anti-GITR.g2", "anti-GITR.g2.g1f" и "anti-GITR.g2.g1.1.f") индуцировали секрецию IL-2 из 3А9-hGITR клеток в большей степени, чем их аналоги, содержащие константный участок IgG1 ("anti-GITR.g1f" и "anti-GITR.g1.1.f").

В совокупности, данные результаты говорят о том, что антитела к GITR, имеющие шарнир IgG2 и константные участки g1 или g1.1 являются более активными, чем те же антитела, имеющие шарнир IgG1. Одним возможным механизмом, объясняющим улучшенные эффекты антител к GITR, содержащих шарнир IgG2, является повышенная интернализация и/или повышенное образование комплексов этих антител на поверхности клетки в сравнении с такими же антителами, которые содержат шарнир IgG1.

Пример 21. Индуцируемая антителом к GITR пролиферация является характерной для  $T_{eff}$  клеток.

GITR экспрессируется как на мышинных, так и на человеческих регуляторных Т-клетках ( $T_{reg}$ ). Данные в литературе показали, что агонистические антитела к GITR управляют пролиферацией мышинных CD4+Foxp3- эффекторных Т-клеток ( $T_{eff}$ ) в присутствии  $T_{reg}$  клеток. Кроме того, предполагалось, что этот эффект управляется преимущественно посредством связывания антитела к GITR с  $T_{eff}$  клетками, а не непосредственными эффектами в отношении функции супрессии  $T_{reg}$  клеток. В других публикациях

показано, что антитела к GITR управляют пролиферацией  $T_{reg}$  клеток и могут индуцировать нестабильность линии  $T_{reg}$  клеток, характеризующуюся потерей Foxp3.

С целью оценки эффектов антител к GITR в отношении функции  $T_{reg}$  клеток проводили анализ супрессии мышечных  $T_{reg}$  клеток, в котором  $T_{eff}$  клетки стимулировали антителом к CD3 и различными изотипами mAb DTA-1 к мышечному GITR в присутствии APC и пропорциональных количеств  $T_{reg}$  клеток. Результаты показали, что обработка антителом DTA-1 повышала пролиферацию по сравнению с изотипическим контролем. Более того, все изотипы IgG1, 2a, 2b и инертный IgG1 D265A были эффективны в повышении пролиферации  $T_{eff}$  клеток, тем самым демонстрируя, что связывание FcR не требуется для функционирования антитела к GITR в данной системе.

Из предыдущего эксперимента не было понятно, была ли повышенная пролиферация  $T_{eff}$  обусловлена антителами к GITR, действующими на  $T_{reg}$  и/или  $T_{eff}$  клетки. Для решения этого вопроса использовали мышей с "нокином" по гену человеческого GITR (huGITR KI). У этих мышей ген, кодирующий мышечный GITR, Tnfrsf18, был заменен человеческим геном TNFRSF18, и человеческий GITR экспрессируется аналогично muGITR у мышей дикого типа; человеческий GITR экспрессируется как на  $T_{eff}$ , так и на  $T_{reg}$  клетках, причем на последних при более высоком уровне. Было обнаружено, что mAb к человеческому GITR 28F3 способно управлять пролиферацией  $T_{eff}$  клеток из huGITR KI мышей. Поскольку 28F3 связывается с человеческим GITR, а не с мышечным GITR, можно создать систему для анализа супрессии  $T_{reg}$ , в которой GITR может дифференциально оказывать целенаправленное воздействие на  $T_{eff}$  и  $T_{reg}$  клетки. Эта система также обеспечивает возможность оценки функциональных различий между 28F3 либо с Fc-участком человеческого IgG1, либо с инертным Fc-участком IgG1.1.

$T_{reg}$  и  $T_{eff}$  клетки подвергали сортировке по экспрессии CD4 и CD25 из huGITR KI и WT мышей. WT и huGITR  $T_{reg}$  и  $T_{eff}$  клетки смешивали в комбинациях, которые обеспечивали возможность целенаправленного воздействия 28F3 либо на  $T_{reg}$ , либо на  $T_{eff}$  клетки в едином замкнутом объеме (huGITR KI  $T_{eff}$  клетки с  $T_{reg}$  клетками дикого типа и т.д.). В качестве контролей включали условия, при которых 28F3 может связываться как с  $T_{reg}$ , так и с  $T_{eff}$  клетками или не может связываться ни с какими из них. Культуры, содержащие  $T_{eff}$  и  $T_{reg}$ , стимулировали антителом к CD3 в присутствии APC и любого из 28F3 IgG1, 28F3 IgG1.1 или изотипического контроля.

Результаты представлены на фиг. 60. Как ожидалось, повышение пролиферации  $T_{eff}$  клеток наблюдали тогда, когда 28F3 могло связываться как с  $T_{reg}$ , так и с  $T_{eff}$  клетками, и этот эффект сохранялся в условиях, при которых 28F3 могло связываться только с  $T_{eff}$  клетками. В противоположность, когда 28F3 было способно связываться только с  $T_{reg}$  клетками, не происходило повышения пролиферации  $T_{eff}$  в сравнении с изотипическим контролем. Что касается изотипа, отсутствовало различие между Fc IgG1 и IgG1.1 в условиях, когда 28F3 показывало эффект. Это согласуется с описанными выше данными, показывающими, что перекрестное сшивание с Fc не требуется для агонизма антитела к GITR. В своей совокупности в данной системе антитела к GITR действуют преимущественно благодаря своей способности модулировать функцию  $T_{eff}$  клеток, а не благодаря ингибированию способности к супрессии  $T_{reg}$  клеток. Тем не менее, это не исключает роли передачи сигнала с помощью GITR на  $T_{reg}$  клетках *in vivo*, поскольку антитела к GITR могут управлять пролиферацией  $T_{reg}$  клеток или обеспечивать  $T_{reg}$ -специфичную мишень для ADCC или ADCP.

Пример 22. Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC).

Активность ADCC *in vitro* для 28F3.IgG1f и 28F3.IgG1.1f оценивали с использованием либо NK92/CD16 клеток или первичных NK-клеток в качестве эффекторов, а ряд клеток, которые, как известно, экспрессируют GITR, использовали в качестве мишеней.

За трое суток до анализа целевые субпопуляции CD4+ и CD8+ Т-клеток выделяли посредством отрицательной селекции и  $T_{reg}$  дополнительно выделяли из числа CD4+ Т-клеток посредством положительной селекции по CD25. Каждую из Т-клеточных субпопуляций стимулировали в течение трех суток с использованием гранул с CD2/CD3/CD28 (Miltenyi Biotec) для индукции повышения экспрессии GITR. За сутки до анализа первичные NK-клетки выделяли из свежих PBMC посредством отрицательной селекции (StemCell Technologies, Inc) и инкубировали в течение ночи в среде MyeloCult H5100 (StemCell), дополненной 500 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 (R&D Systems) и 1 мкМ гидрокортизоном (StemCell). В день анализа эффекторные клетки (первичные NK-клетки или NK92/CD16) инкубировали с мечеными кальцеином AM активированными Т-клетками при определенных соотношениях эффектора и мишени в присутствии 1 мкг/мл 28F3.IgG1f и 28F3.IgG1.1f.

При использовании первичных NK-клеток или NK92/CD16 клеток в качестве эффекторов 28F3.IgG1 индуцировало лизис активированных CD4+ Т-эффекторов и  $T_{reg}$  клеток, в то время как наблюдали меньший лизис активированных CD8+ Т-клеток (фиг. 61). Как ожидалось, 28F3.IgG1.1 не опосредовал ADCC любых клеток-мишеней при использовании либо NK92 или первичных NK клеток в качестве эффекторов. Таким образом, 28F3.IgG1 индуцировал лизис активированных CD4+ Т-эффекторов и  $T_{reg}$  клеток и, в меньшей степени, активированных CD8+ Т-клеток, и уровень лизиса, индуцируемого 28F3.IgG1, оказывается пропорциональным уровню экспрессии GITR на клетках-мишенях.

Пример 23. Активность антитела 28F3.IgG1 у мышей с "нокином" по человеческому GITR.

В этом примере показано, что 28F3.IgG1 и 28F3IgG1.1 характеризуются противоопухолевой актив-

ностью в опухолях MC38 у C57BL/6 мышей, имеющих человеческую иммунную систему и человеческий белок GITR, и что противоопухолевая активность является более сильной с 28F3.IgG1.

Получение мышей с "нокином" по человеческому GITR C57BL/6 мышей подвергали генному конструированию для экспрессии внеклеточного домена человеческого GITR (ECD) вместо ECD мышинового GITR, сохраняя интактными мышинные последовательности трансмембранного и цитоплазматического доменов. Экспрессию химерного человеческого/мышинового GITR подтверждали путем окрашивания активированных антителами к CD3/CD28 клеток селезенки с использованием антитела к человеческому GITR.

MC38 клетки культивировали в среде DMEM с 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-глутамином, 4,5 г/л (45%) глюкозы (10 мл/л) и 1 mM пируватом натрия (10 мл/л). Клетки разделяли в соотношении 1:10 каждые 2 суток. Использовали две когорты мышей и для обеих групп в правую боковую поверхность живота каждой мыши подкожно имплантировали 0,75 миллиона MC38 клеток в 0,2 мл PBS с использованием шприца объемом 1-см<sup>3</sup> и полудюймовой иглы 25 калибра. В случае когорты 1 в День 7 после имплантации 40 мышей рандомизировали на 3 группы по 12-13 мышей в каждой в соответствии с объемом опухоли (L×W×H/2). Все группы имели средние объемы опухолей, составляющие примерно 174 мм<sup>3/2</sup>. В Дни 7, 10 и 14 контрольную среду или mAb вводили в дозе 10 мг/кг. В случае когорты 2 в День 7 после имплантации 10 мышей рандомизировали на 2 группы по 5 мышей в каждой в соответствии с объемом опухоли (L×W×H/2). Все группы имели средние объемы опухолей, составляющие примерно 69 мм<sup>3/2</sup>. В Дни 7, 10 и 14 контрольную среду или mAb 28F3.IgG1 вводили в дозе 10 мг/кг.

Мыши получали дозы внутривенно (IP), причем концентрации и даты обобщены в табл. 9.

Таблица 9

Группы	Дни после имплантации
Изотип IgG1, 10 мг/кг	7, 10 и 14
28F3.IgG1, 10 мг/кг	7, 10 и 14
28F3.IgG1.1f, 10 мг/кг	7, 10 и 14

Измерения опухолей и массы тела проводили дважды в неделю до завершения исследования. Опухоли измеряли в 3 направлениях с использованием штангенциркуля с электронным цифровым отсчетом Fowler (модель 62379-531; Fred V. Fowler Co., Ньютон, Массачусетс) и данные записывались в электронной форме с использованием программного обеспечения StudyDirector от Studylog Systems, Inc. (Южный Сан-Франциско, Калифорния).

Для когорты 1 исследование опухоли завершали в День 52 после имплантации. Microsoft Excel использовали для расчета среднего значения, стандартного отклонения (SD) и медианного значения для объемов опухолей и значений массы тела. Средние и медианные значения рассчитывали, когда в каждой группе обработки оставалось 100% и по меньшей мере 60% из экспериментальных животных соответственно. Опухоли из мышей из когорты 2 собирали в День 15.

Результаты указывают на то, что в День 22 после имплантации опухоли, последний день, когда все участвующие в исследовании мыши были живы, использование дозы 10 мг/кг 28F3.IgG1 показывало 67% среднее ингибирование роста опухоли (TGI) в ксенотрансплантатах MC38 по сравнению с антителом изотипического контроля. Значения TGI у опухолей представлены для группы обработки в табл. 10. Кривые роста опухоли для группы обработки показаны на фиг. 62A-62C. Кривые среднего и медианного роста опухоли для группы обработки представлены на фиг. 63A, 63B. Токсичность не была явно выражена в какой-либо группе обработки, поскольку изменения средней и медианной массы тела составляли менее 20%. Значения массы тела мышей и изменения в процентах со временем показаны на фиг. 64A, 64B.

Таблица 10

Группа обработки	День 22		День 25	
	Средний объем опухоли (мм <sup>3</sup> )	TGI (%)	Медианный объем опухоли (мм <sup>3</sup> )	TGI (%)
Изотип IgG1, 10 мг/кг	1342	Н/Д	1790	Н/Д
28F3.IgG1, 10 мг/кг	447	67	380	79
28F3.IgG1.1f, 10 мг/кг	1049	22	1064	41

Результаты показывают, что 28F3.IgG1 характеризовалось 67% TGI, тогда как 28F3.IgG1.1f характеризовалось 22% TGI в День 22 после имплантации, указывая на то, что оба антитела снижали рост опухоли в модели опухоли MC38. Кроме того, результаты говорят о том, что связывание Fc 28F3.IgG1 усиливает противоопухолевую активность в модели опухоли MC38.

Для изучения эффекта, который оказывает 28F3.IgG1 в отношении популяций Т-клеток, собирали ткани от 5 мышей в каждой группе обработки в День 15 после имплантации. Селезенки и опухоли подвергали обработке в гомогенизаторе gentleMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi, Сан-Диего, Калифорния).

Суспензии отдельных клеток подвергали окрашиванию в отношении Т-клеточных маркеров с использованием проточной цитометрии (FACS). Флуоресценцию антитела выявляли с помощью проточной цитометрии на Fortessa (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) и результаты анализировали с использованием компьютерной программы Flowjo (Flowjo, LLC, Ашленд, Орегон).

Результаты, которые приведены на фиг. 65 и 66, показывают уменьшенный процент  $T_{reg}$  клеток, что согласуется с сокращением их количества у мышей, обработанных 28F3.IgG1, в сравнении с изотипическим контролем (фиг. 65). Напротив, присутствовало повышение процента CD8+ Т-клеток в группе 28F3.IgG1 (фиг. 66).

Таким образом, мониторинг иммунной системы у мышей, обработанных 28F3.IgG1 по сравнению с изотипическим контролем говорит о том, что TGI может быть опосредовано сокращением количества  $T_{reg}$  и повышением уровня CD8+ Т-клеток.

Пример 24. Перекрестное сшивание 28F3.IgG1 повышает его активность.

В этом примере показано, что перекрестное сшивание 28F3.IgG1 повышает его активность в отношении усиления секреции IFN- $\gamma$  Т-клетками и стимуляции пролиферации Т-клеток.

Т-клетки культивировали совместно либо с CHO-ОКТ3 клетками, либо с CHO-ОКТ3-CD32a<sup>high</sup> клетками в присутствии различных концентраций антител к GITR или контрольных реактивов и измеряли уровни секреции интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и клеточной пролиферации. Клеточная линия CHO-ОКТ3-CD32<sup>high</sup> характеризуется очень высоким уровнем Fc-рецептора CD32a и немного более высоким уровнем экспрессии ОКТ3, чем ее исходный клон CHO-ОКТ3.

Анализ проводили следующим образом. Т-клетки-респондеры получали из человеческих PBMC, выделенных в градиенте плотности фиколла (Amersham Bioscience 17-1440-03), с использованием набора для выделения CD4 Т-клеток (Life technologies, № 113.31D в каталоге) и микрогранул с CD25 (Miltenyi, № 130-092-983 в каталоге) в соответствии с протоколом производителя. CHO клетки, экспрессирующие scFv к CD3 (ОКТ3) (CHO-ОКТ3), или CHO клетки, экспрессирующие scFv к CD3 и CD32a, промытые дважды средой RPMI, подвергали облучению дозой 50 тысяч Рад. Клетки собирали и ресуспендировали в среде культивирования (RPMI-1640, дополненная 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамином, 55 нМ  $\beta$ -меркаптоэтанолом, 1 мМ пируватом натрия и 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина) в концентрации  $2,5 \times 10^5$ /мл. Высевали  $2,5 \times 10^4$  CHO клеток и  $1 \times 10^5$  Т-клеток на лунку в 96-луночном плоскодонном планшете, относящемся к классу, подходящему для тканевой культуры (TC) (Costar). Клетки инкубировали с 4-кратным титрованием антителом к GITR в 8 разных концентрациях, начиная с 20 мкг/мл. Неродственный hIgG1 добавляли в концентрации 20 мкг/мл в качестве изотипического контроля. Образец, содержащий только клетки, включали для того, чтобы показать фоновую активность без какой-либо обработки. Супернатант из каждого образца собирали в День 3 для измерения уровня IFN- $\gamma$  (набор BD optEIA human IFN-g ELISA Kit; BD Bioscience; № 555142). Пролиферацию клеток оценивали по включению <sup>3</sup>H-тимидина в течение последних 8 ч инкубирования. Результаты, которые показаны на фиг. 67 и 68, указывают на то, что в присутствии 28F3.IgG1 больше IFN- $\gamma$  секретировалось из Т-клеток, которые культивировали совместно с CHO-ОКТ3-CD32a<sup>high</sup>, в сравнении с клетками, которые культивировали совместно с CHO-ОКТ3 клетками (фиг. 67). Как ожидалось, не наблюдали какого-либо существенного различия с антителом 28F3.IgG1.1f с отсутствующей эффекторной функцией, которое не связывается с CD32a. Кроме того, в присутствии 28F3.IgG1 большую Т-клеточную пролиферацию наблюдали у Т-клеток, которые культивировали совместно с CHO-ОКТ3-CD32a<sup>high</sup>, в сравнении с клетками, которые культивировали совместно с CHO-ОКТ3 клетками; этот эффект не наблюдался с антителом 28F3.IgG1.1f с отсутствующей эффекторной функцией (фиг. 68). Таким образом, перекрестное сшивание 28F3.IgG1 повышает его активность в отношении усиления секреции IFN- $\gamma$  Т-клетками и стимуляции пролиферации Т-клеток. Этот активирующий эффект также наблюдали в отношении пролиферации Т-клеток с CHO-ОКТ3 клетками, экспрессирующими низкие уровни CD32a. GITR.6 g1.1f показывает повышенные уровни IFN- $\gamma$  в перекрестно сшитом состоянии по сравнению с растворимым состоянием. Вероятно, это является отражением несколько более высокого уровня экспрессии ОКТ3 на CHO-ОКТ3-CD32a<sup>high</sup> клетках в сравнении с CHO-ОКТ3 клетками. Повышение, наблюдаемое с перекрестно сшитым GITR.6 g1f, является большим, чем наблюдаемое с инертным изотипом, что говорит о положительном эффекте от перекрестного сшивания. Вариант G1f обеспечивает высокие уровни IFN- $\gamma$  даже в низких дозах там, где растворимые антитела демонстрировали небольшой агонизм по сравнению с фоновым уровнем, что опять-таки говорит о положительной роли перекрестного сшивания.

Таким образом, как антитело 28F3.IgG1, так и антитело 28F3.IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией стимулируют продукцию IFN- $\gamma$  и стимулируют пролиферацию Т-клеток, тем не менее, перекрестное сшивание 28F3.IgG1 дополнительно повышает его активность в отношении усиления секреции IFN- $\gamma$  Т-клетками и стимуляции пролиферации Т-клеток.

Таблица 11

## Краткое описание перечня последовательностей

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	Изоформа 1 человеческого G1TR	MAQHGMAGAFRALCGLALLCALS LGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGD ARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHH PCPPGGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFG FLTVPFGNKT HNACVPGSPPAEPLGWLTVVLLAVAAACVLLLTSAQ LGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPFEEERGERSA EEKGR LGDLWV
2	Изоформа 2 человеческого G1TR	MAQHGMAGAFRALCGLALLCALS LGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGD ARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHH PCPPGGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCWRC RRRPKTPEAASPRKSGASDRRRRGWETCGCEPGRPPGPTAAS PSFGAPQAAGALRSALGRALLPWQKQWVQEGGSDQRPFGCSAAAA GPCRRERETQSWPPSSLAGFDVGS
3	Изоформа 3 человеческого G1TR	MAQHGMAGAFRALCGLALLCALS LGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGD ARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHH PCPPGGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFG FLTVPFGNKT HNACVPGSPPAEPLGWLTVVLLAVAAACVLLLTSAQ LGLHIWQLRKTQLLLEVPSTEDARSCQFPFEEERGERSAEEKGR LG DLWV
4	Человеческий G1TR (зрелый)	QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWD CMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGGVQSQGKFSFGFQCIDCAS GTFSGGHEGHCKPWTDCQFGFLTVPFGNKT HNACVPGSPPAEP MCASGTLCCALLCAAS LGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRV HPTTRCCRDYPGEECCSEWDCVQPEFHCGNCPCTTCQHHPGPSGQ GVQPQKFSFGFRVDCALGTFSRGHDGHCKPWTDCQFGFLTVP GNKT HNACVPGSPPAEPGWLT I ILLAVAAACVLLLTSAQLGLHIW QLRSQPTGPRETQLLLEVPSTEDASSCQFPFEEERGERLAEKGR LG DLWV
5	G1TR яванского макака	MCASGTLCCALLCAAS LGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRV HPTTRCCRDYPGEECCSEWDCVQPEFHCGNCPCTTCQHHPGPSGQ GVQPQKFSFGFRVDCALGTFSRGHDGHCKPWTDCQFGFLTVP GNKT HNACVPGSPPAEPGWLT I ILLAVAAACVLLLTSAQLGLHIW QLRSQPTGPRETQLLLEVPSTEDASSCQFPFEEERGERLAEKGR LG DLWV
6	Человеческий G1TR-L	MTLHPSPI TCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRTQGAQRS SW KLWLFCSI VMLLFLCSF SWLI FIFLQLETAKEPCMAKFGFLPSKWQ MASSEFPVCNVKVS DWKLEILLQNGLYLIYGQVAPNANYNVAVPFV LYKNKDMI QTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDT I DLI FNSEHQVLKNN TYWGI ILLANPQFIS
7	Константный домен человеческого IgG1	ASTKGFVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQK SLSLSPG
8	Константный домен человеческого IgG1 (аллотипический вариант)	ASTKGFVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQK SLSLSPG
9	Константный домен человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235E и G237A	ASTKGFVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLV

		KGFPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
10	Константный домен человеческого IgG1 с мутациями A330S и P331S	ASTKGFSPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNT KVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
11	Константный домен человеческого IgG1.1 (мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S)	ASTKGFSPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNT KVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQK SLSLSPG
12	Константный участок легкой каппа-цепи (CL) человеческого IgG1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKDVA LQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
13	28F3 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGDIYYGMDVWGQGTITVTVSS
14	28F3 (VL)	AIQLTQSPSSLSASVGRVITICRASQGISALAWYQQKPKAPKL LIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQFN SYFYTFGQGTKEIK
15	28F3 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGDIYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGFVFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDVE PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSGFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
16	28F3 (полноразмерная легкая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	AIQLTQSPSSLSASVGRVITICRASQGISALAWYQQKPKAPKL LIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQFN SYFYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNN FYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	28F3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGDIYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGFVFLAPC SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKT HTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
18	28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGDIYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGFVFLAPC SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKT HTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG

		GKEYKCKVSNKALPSSI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
19	28F3.IgG1 (VL + CL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISALAWYQQKPKKAPKL LIYDASSLESVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	CDR1 VH 28F3	SYGMH
21	CDR2 VH 28F3	VIWYEGSNKYYADSVKQ
22	CDR3 VH 28F3	GGSMVVRGDIYYGMDV
23	CDR1 VL 28F3	RASQGISSALA
24	CDR2 VL 28F3	DASSLES
25	CDR3 VL 28F3	QQFNSYPYT
26	19D3 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLE WVAWIWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGQLDYIIYYVMDVWGQGTITVTVSS
27	19D3 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISALAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLE IK
28	19D3 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLE WVAWIWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGQLDYIIYYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTRVVSVLTVLHQDNLGKEYK CKVSNKGLPAPI E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	19D3 (полноразмерная легкая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISALAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
30	19D3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLE WVAWIWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGQLDYIIYYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPAPPELLEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRVVSVLTVLHQDNLG KEYKCKVSNKALPAPI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	19D3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLE WVAWIWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGQLDYIIYYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPAPPELLEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRVVSVLTVLHQDNLG KEYKCKVSNKALPSSI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	19D3.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISALAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQYN

		SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	CDR1 VH 19D3	SYGFH
34	CDR2 VH 19D3	VIWYAGSNKFYADSVKG
35	CDR3 VH 19D3	GGQLDYYYYYVMDV
36	CDR1 VL 19D3	RASQGISWLA
37	CDR2 VL 19D3	AASSLQS
38	CDR3 VL 19D3	QQYNSYPYT
39	18E10 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGTITVTVSS
40	18E10 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFGQGTKLEIK
41	18E10 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVHDHPSNTPKVDKTVKRCVCECF PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTIVHQQDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTI S KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	18E10 (полноразмерная легкая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	18E10.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTPKVDKRVPEPKCDKTH TCPPEPAPELLGGPSVFLF PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
44	18E10.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTPKVDKRVPEPKCDKTH TCPPEPAEAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPSSIEKTI S KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
45	18E10.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
46	CDR1 VH 18E10	SYGMH
47	CDR2 VH 18E10	VIWYAGSNKYADSVKG

48	CDR3 VH 18E10	GGRIAVAFYYSMDV
49	CDR1 VL 18E10	RASQGISSWLA
50	CDR2 VL 18E10	AASSLQS
51	CDR3 VL 18E10	QQYNSYPYT
52	3C3 (VH)	QVQLQQWGAGLLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWTWIRQPPGKGLE WIGKINHSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVSS
53	3C3 (VL1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFGQGTKLEIK
54	3C3 (VL2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRS NWHTFGQGTKLEIK
55	3C3 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLQQWGAGLLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWTWIRQPPGKGLE WIGKINHSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	3C3 L1 (полноразмерная легкая цепь 1 дикого типа)  Константный участок подчеркнут	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSEFVTKSFNRGEC
57	3C3 L2 (полноразмерная легкая цепь 2 дикого типа)  Константный участок подчеркнут	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRS NWHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSEFVTKSFNRGEC
58	3C3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLQQWGAGLLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWTWIRQPPGKGLE WIGKINHSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLF PPPKKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
59	3C3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLQQWGAGLLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWTWIRQPPGKGLE WIGKINHSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
60	3C3.IgG1 (VL1 + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

		FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADY YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
61	3C3IgG1.2 (VL2 + CL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSELEPEDFAYVYCCQRS NWHTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFI YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	CDR1 VH 3C3	GYWT
63	CDR2 VH 3C3	KINHSGNTNYPNLSLKS
64	CDR3 VH 3C3	LGAFDAFDI
65	CDR1 VL1 3C3	RASQGISWLA
66	CDR2 VL1 3C3	AASSLQS
67	CDR3 VL1 3C3	QQYNSYPYT
68	CDR1 VL2 3C3	RASQGVSSYLA
69	CDR2 VL2 3C3	DASNRAT
70	CDR3 VL2 3C3	QQRSNWHT
71	2G6 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI <del>LS</del> SDYGMHWVRQAPGKGL E WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGGRFTISRDNKNTLYLQMN <del>SL</del> RVEDTA VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGT <del>TVT</del> VSSASTKGPSVFP LAPC
72	2G6 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISWLA <del>WY</del> QQKPEKAPK S LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFATYYCQY N SYPYTFGQGTKEIK
73	2G6 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI <del>LS</del> SDYGMHWVRQAPGKGL E WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGGRFTISRDNKNTLYLQMN <del>SL</del> RVEDTA VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGT <del>TVT</del> VSSASTKGPSVFP LAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS <del>GV</del> H <del>TF</del> PAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN <del>HK</del> PSNTKVDKRV <del>EP</del> PKSCDKT HTCPCPAPAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI <del>S</del> RTPEVTCVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVH <del>QD</del> WLN <del>KEY</del> KCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKAGQPREPQVY <del>TL</del> LPSPREMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK <del>TT</del> PPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV <del>F</del> SCVMHEALH <del>NHY</del> TQKSL <del>SL</del> SPG
74	2G6 (полноразмерная легкая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISWLA <del>WY</del> QQKPEKAPK S LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFATYYCQY N SYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFI YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
75	2G6.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI <del>LS</del> SDYGMHWVRQAPGKGL E WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGGRFTISRDNKNTLYLQMN <del>SL</del> RVEDTA VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGT <del>TVT</del> VSSASTKGPSVFP LAPC SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS <del>GV</del> H <del>TF</del> PAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN <del>HK</del> PSNTKVDKRV <del>EP</del> PKSCDKT HTCPCPAPAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI <del>S</del> RTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVH <del>QD</del> WLN <del>KEY</del> KCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKAGQPREPQVY <del>TL</del> LPSPREMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK <del>TT</del> PPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV <del>F</del> SCVMHEALH <del>NHY</del> TQKSL <del>SL</del> SPG
76	2G6.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI <del>LS</del> SDYGMHWVRQAPGKGL E WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGGRFTISRDNKNTLYLQMN <del>SL</del> RVEDTA VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGT <del>TVT</del> VSSASTKGPSVFP LAPC SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS <del>GV</del> H <del>TF</del> PAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN <del>HK</del> PSNTKVDKRV <del>EP</del> PKSCDKT HTCPCPAPAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI <del>S</del> RTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVH <del>QD</del> WLN <del>KEY</del> KCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKAGQPREPQVY <del>TL</del> LPSPREMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK <del>TT</del> PPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV <del>F</del> SCVMHEALH <del>NHY</del> TQKSL <del>SL</del> SPG

77	2G6.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
78	CDR1 VH 2G6	DYGMH
79	CDR2 VH 2G6	VIWYDGSNKFFVDSVKG
80	CDR3 VH 2G6	GGRLATGHFFYYVMDV
81	CDR1 VL 2G6	RASQGISSWLA
82	CDR2 VL 2G6	AASSLQS
83	CDR3 VL 2G6	QQYNSYPYT
84	8A6 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGKGLWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSS
85	8A6 (VL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKFLIYDASSLESVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFGGQTKLEIK
86	8A6 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGKGLWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYICNVNDHKPSNTKVDKTRVERKCCVCECPCCPAPFPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVYVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SSKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	8A6 (полноразмерная легкая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKFLIYDASSLESVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
88	8A6.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGKGLWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKTRVEPKSCDKHTCCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SSKAGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
89	8A6.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMQWVRQAPGKGLWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKTRVEPKSCDKHTCCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SSKAGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
90	8A6.IgG1 (VL + CL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKFLIYDASSLESVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
91	CDR1 VH 8A6	SYGMQ

92	CDR2 VH 8A6	VIWYEGSNKYYADSVKG
93	CDR3 VH 8A6	GGLMVRGLFYGM DV
94	CDR1 VL 8A6	RASQGISSALA
95	CDR2 VL 8A6	DASSLES
96	CDR3 VL 8A6	QQFNSEYPYT
97	9G7 (VH)	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYYGMDVWGQGTSTVTVSS
98	9G7 (VL1)	EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPWTFGQGTKEIK
99	9G7 (VL2)	EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVTSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPERFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPITFGQGTREIK
100	9G7 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVESKYGPE CPSCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISTRPEVTCVVVDVSDPE EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCRVSNKGLPSSIEKTIKSAKGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
101	9G7 L2 (полноразмерная легкая цепь 2 дикого типа)  Константный участок подчеркнут	EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVTSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPERFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPITFGQGTREIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLN NFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
102	9G7.IgG1 (VH + IgG1)	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVESKYGPE THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISTRPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKSAKGGPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
103	9G7.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVESKYGPE THTCPPCPAEEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISTRPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKSAKGGPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
104	9G7.IgG1 (VL1 + CL)	EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPWTFGQGTKEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLN NFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
105	9G7.IgG1.2 (VL2 + CL)	EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVTSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPERFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPITFGQGTREIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLN

		NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
106	CDR1 VH 9G7	TVWMS
107	CDR2 VH 9G7	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG
108	CDR3 VH 9G7	GQLIPYSYYGMDV
109	CDR1 VL1 9G7	RASQSVSSSYLA
110	CDR2 VL1 9G7	GASSRAT
111	CDR3 VL1 9G7	QQYGSSPWT
112	CDR1 VL2 9G7	RASQSVTSSSYLA
113	CDR2 VL2 9G7	GASSRAT
114	CDR3 VL2 9G7	QQYGSSPIT
115	14E3 (VH)	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGNTYYNPSLKSRTIISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWGQTMVTVSS
116	14E3 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPTFGQGTKEIK
117	14E3 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGNTYYNPSLKSRTIISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWGQTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCKDKTHTCPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
118	14E3 (полноразмерная легкая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
119	14E3.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGNTYYNPSLKSRTIISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWGQTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCKDKTHTCPCP APELLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
120	14E3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGNTYYNPSLKSRTIISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWGQTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCKDKTHTCPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
121	14E3.IgG1 (VL + CL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

122	CDR1 VH 14E3	GYYS
123	CDR2 VH 14E3	EINHSGNTYYNPSLKS
124	CDR3 VH 14E3	FGSNDAFDI
125	CDR1 VL 14E3	RASQGISSWLA
126	CDR2 VL 14E3	AASSLQS
127	CDR3 VL 14E3	QQVNSYPPT
128	19H8 (VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNLSRAEDTA VYYCARGGAMVRGVYVYGMVWVGGQTTVTVSSASTKGPSVFPPLAPS
129	19H8 (VL1)	AIQLTQSPSSLSASVGDVITTCRASQGISSALAWYQQKPKAPKF LIYDASSLESQVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQFN SYPTFGQGTKEIK
130	19H8 (VL2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRTGIPARFSGSGSDTFTLTISLQPEDFAVYVCQQRN NWPLTFGGGTKEIK
131	19H8 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа)  Константный участок подчеркнут	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNLSRAEDTA VYYCARGGAMVRGVYVYGMVWVGGQTTVTVSSASTKGPSVFPPLAPS SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVYVSVLTVLHQQDWLNKQVSL KCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSEFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
132	19H8 L1 (полноразмерная легкая цепь 1 дикого типа)  Константный участок подчеркнут	AIQLTQSPSSLSASVGDVITTCRASQGISSALAWYQQKPKAPKF LIYDASSLESQVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQFN SYPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
133	19H8 L2 (полноразмерная легкая цепь 2 дикого типа)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRTGIPARFSGSGSDTFTLTISLQPEDFAVYVCQQRN NWPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
134	19H8.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNLSRAEDTA VYYCARGGAMVRGVYVYGMVWVGGQTTVTVSSASTKGPSVFPPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDWLNKQVSLTCLV SNKALPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPG
135	19H8.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNLSRAEDTA VYYCARGGAMVRGVYVYGMVWVGGQTTVTVSSASTKGPSVFPPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPG
136	19H8.IgG1 (VL1 + CL)	AIQLTQSPSSLSASVGDVITTCRASQGISSALAWYQQKPKAPKF LIYDASSLESQVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQFN

		SYFQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
137	19H8.IgG1.2 (VL2 + CL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQR NWPLT FGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
138	CDR1 VH 19H8	NYGMH
139	CDR2 VH 19H8	VIWYGGSNKFYADSVKG
140	CDR3 VH 19H8	GGAMVRGVYYGMDV
141	CDR1 VL1 19H8	RASQGISSALA
142	CDR2 VL1 19H8	DASSLES
143	CDR3 VL1 19H8	QQFNSYPQT
144	CDR1 VL2 19H8	RASQSVSSYLA
145	CDR2 VL2 19H8	DASNRAT
146	CDR3 VL2 19H8	QQRSNWPLT
147	Нуклеотидная последовательность 28F3 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAG CTATGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATAAATATTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACTCTCCAGAGACAATCCAAGAA CAGCGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACCGGCT GTGTATTACTGTGCAGAGGGGGGAGTATGGTTCGGGGGACTACT ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACCAAGCTCACCGTCTC CTCA
148	Нуклеотидная последовательность 28F3 (VL)	GCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTACCATCACTTGCCTGGCAAGTCCAGGCAATTAGCAG TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCTCCTAAGCTC CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
149	Нуклеотидная последовательность 28F3 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAG CTATGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATAAATATTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACTCTCCAGAGACAATCCAAGAA CAGCGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACCGGCT GTGTATTACTGTGCAGAGGGGGGAGTATGGTTCGGGGGACTACT ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACCAAGCTCACCGTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTCCCCCTGGCGCCTGC TCCAGGAGCACCTCCAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGC TCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACT TCGGCACCAGACTACACTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAA CACCAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTGTCGAGTGC CCACCGTCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTCTCCTCT TCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGACCCAGGTC CAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGA CAAAGCCACGGGAGGACAGTTCAACAGCAGCTCCGTGTGGTCAG CGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCCGAGCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAACAACTACAGACCCACCTCC

		<u>CATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC</u> <u>GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCG</u> <u>TGATGCATGAGGCTCTGCACACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTC</u> <u>CCTGTCTCCGGTAAA</u>
150	Нуклеотидная последовательность 28F3 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	<u>GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG</u> <u>GAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG</u> <u>TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCTCCTAAGCTC</u> <u>CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT</u> <u>TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG</u> <u>CCTCCAGCCTGAGATTTTGCACCTTATTACTGTCLACAGTTTAAAT</u> <u>AGTACCCCGTACACTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC</u> <u>GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGGCCATCTGATGA</u> <u>GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGGCTGCTGAATAAC</u> <u>TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCT</u> <u>TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA</u> <u>GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA</u> <u>GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG</u> <u>GCCTGAGCTCGCCCGTACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u>
151	Нуклеотидная последовательность 28F3.IgG1 (VH + IgG1)	caagtgacgc tggtagagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tcctgtgca cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gctgtagtgc ggtggcagtt ataggtatg aaggaagtaa taaatattat gcagactccg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggtgtgt attactgtgc gagagggggg agtatggttc gggggacta ctactacggt atggactctc ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagctagcac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag agcaactctg ggggcaagc ggccctgggc tgctgtgca aggaactact ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgacctg accagcggcg tgcaacactt cccgctgtc ctacagctct caggaacta ctccctcagc agcgtgtgta ccgtgccctc cagcagctg ggcaccaga cctacatctg caactgtaat caaagccca gcaaaccaa ggtgacaag agagttgagc ccaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctctc cccccaaaac ccaaggcac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgctgtgtg gtgacgtga gccacgaaga cctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gcccgggag gagcagtaca acagcagta ccgtgtgtc agcgtctca ccgtctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaacctatc ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccaca tcccggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgtcaa agcctctat cccagcaca tcgcccgtgga gtggagagc aatgggagc cggagaacaa ctacaagacc acgctcccg tctggactc cgaaggtcc ttctctctc atagcaagct caccgtgac aagagcaggt ggcagcagg gaacgtctc tcatgctccg tgatgatga gctctgac aaccaactaca cgcagaagag cctctccctg tcccgggt ga
152	Нуклеотидная последовательность 28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	caagtgacgc tggtagagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tcctgtgca cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gctgtagtgc ggtggcagtt ataggtatg aaggaagtaa taaatattat gcagactccg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat

		<p>ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt  attactgtgc gagagggggg agtatgggtc ggggggacta  ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc  accgtctcct cagctagcac caagggccca tcggtcttcc  ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggacagc  ggccctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaaccg  gtgacgggtg cgtggaactc aggcgacctg accagcggcg  tgcaacacct cccggctgtc ctacagtcct caggactcta  ctccctcagc agcgtgggta ccgtgccctc cagcagcttg  ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagcca  gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaatcttg  tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa  gccgaagggg ccccgctagt ctctctctc ccccaaaac  ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctaggtcac  atgctgtgtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc  aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg  ccaagacaaa gccgcgggag gacagctaca acagcagta  ccgtgtgtgc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg  ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaa  ccctcccaag cagcatcgag aaaacctct ccaagccaa  agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccaca  tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct  gcctggctca aggcttctat cccagcgaca tcgacctgga  gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc  acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttctctctc  atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggacagagg  gaacgtcttc tcatgctcgc tgatgcatga ggctctgac  aacactaca cgcagaagag cctctcctg tccccgggt ga</p>
153	Нуклеотидная последовательность 28F3.IgG1 (VL + CL)	<p>gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat  ctgtaggaga cagagtcacc atcaacttgc gggcaagtea  gggcattagc agtgcttag cctggtatca gcagaacca  gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt  tggaagtggt ggtcccatca aggttcagcg gcagtggtc  tgggacagat ttcaacttca ccatcagcag cctgcagcct  gaagatthtg caacttatta ctgtcaacag ttaaatagtt  accgtacac tttggccaag gggaccaagc tggagatcaa  acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgca  tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgt  gcctgctgaa taacttctat cccagagagc ccaagtaca  gtggaaggtg gataacgccc tcaatcggg taactcccag  gagagtgta cagagcagga cagcaaggac agcacctaca  gcctcagcag caccctgag ctgagcaaaag cagactacga  gaaacacaaa gtctacgctc gcgaagtca ccatcagggc  ctgagctcgc ccgtcacaag gacttcaac aggggagagt  gttag</p>
154	Нуклеотидная последовательность 19D3 (VH)	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAACCTGGGA  GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAG  CTATGGCTTCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAG  TGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATAAATTCATGTCAG  ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCGAAGAA  CACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTAAGAGCCGAGGACACGGCT  GTGTATTACTGTCCGAGAGGGGGACAGTTGGACTACTACTATT  ACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGCTCACCGTCTCCTC  A</p>
155	Нуклеотидная последовательность 19D3 (VL)	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG  GAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAG  CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCAAGTCC  CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT  TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG</p>

		CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
156	Нуклеотидная последовательность 19D3 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAACCTGGGA GGTCCCTGAGACTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTACAGTAG CTATGGCTTCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATAAATCTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATCCAAGAA CACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTAAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCAGAGGGGGGACAGTTGGACTACTACTACTATT ACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCCGCTCCCTC AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCTGCTCC AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGG ACTACTTCCCAGACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCG GCACCCAGACTACACTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTTCGAGTGCCCA CCGTGCCAGCACCTGTGGCAGGACCGTCACTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAG TTCAACTGGTACGTGGAGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGGTCAAGCT CCTCACCGTTGTGCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAGGCTCCAGCCGCCCATCGAGAAACCA TCTCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGACACCT GCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTGACC TGCTGGTCAAAGGCTTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACAAGACCACCTCCCAT GCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTAGACGAAGCTCACCGTG CACAAACAGCAGGTGCCAGCAGGGCAACCTTCTCATGCTCCGTGA TGCAATGAGGCTGTGCACAACCACTACACGCAAGAGCCTTCCCT GTCTCCGGGTAAA
157	Нуклеотидная последовательность 19D3 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCAACATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGGTATTAGCAG CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGAAAGCCCTAAGTCC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAAGTGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTGTGTGCTGTGAATAAC TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC TCCAATCGGTAACCTCCAGGAGGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
158	Нуклеотидная последовательность 18E10 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAACCTGGGA GGTCCCTGAGACTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTACAGTAG CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATAAATACTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATCCAAGAA CACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCAGAGGGGGGCTATAGCAGTGGCCTTCTACT ACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCCGCTCCTC A
159	Нуклеотидная последовательность 18E10 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCAACATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGGTATTAGCAG CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGAAAGCCCTAAGTCC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAAGTGGGTCCCATCAAGGT

		TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTAAGTCCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
160	Нуклеотидная последовательность 18E10 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAG CTATGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGAAGTAATAATACTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAA CACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTAAGTGTGCGAGAGGGGGCGTATAGCAGTGGCCTTCTACT ACAGTATGGAGCTCTGGGGCCAGGGACCAAGGTCACCGTCTCCTC AGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGGGCCCTGCTCC AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCG GCACCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAATGTTGTGTCGAGTGCCCA CCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGAGCTGAGCCAGCAAGACCCCGAGGTCCAG TTCAACTGGTACGTGGAGCGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAA AGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCT CCTCAGCCTTGTGCACAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAGGCTCCAGCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAACAACCAAGGAGCCCGGAGAACCAAGGTGTACACCT GCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACC TGCTGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGAGCGGAGAACAACTACAAGACCCACCTCCAT GCTGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGA TGCAATGAGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAAGCCTCTCCCT GTCTCCGGTAAA
161	Нуклеотидная последовательность 18E10 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGGCAGTCAAGGTATTAGCAG CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGAGAAAGCCCTAAGTCC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTAAGTCCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAAC TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCC TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTTCCGAGTCAACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
162	Нуклеотидная последовательность 3C3 (VH)	CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCTCACCTGCGTGTCTATGGTGGGCTCCTCAGTGG TACTACTGGACCTGGATCGCCAGCCCCAGGGAAGGGCTGGAG TGGATTGGGAAAATCAATCATAGTGGAAAACCAACTACAACCCGT CCCTCAAGAGTCGAGTACCATATCAGTAGACACGTCCTCAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAGGGCTGTG TATTAAGTGTGCGAGACTGGGGCCCTTTGATGCTTTGATATCTGGG GCCAAGGGACAATGGTCAACGCTCTTCA
163	Нуклеотидная последовательность 3C3 (VL1)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGGCAGTCAAGGTATTAGCAG CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGAGAAAAGCCCTAAGTCC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGT

		TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTGGCAACTTATTAAGTCCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
164	Нуклеотидная последовательность 3С3 (VL2)	GAAATTTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGGTGTTAGCAG CTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGGCTC CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGT TCAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTAAGTGTCCAGCAGCTAGC AACTGGCACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
165	Нуклеотидная последовательность 3С3 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTCTTCACTAGTGG TTACTACTGGACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGATTTGGGAAAATCAATCATAGTGGAAAACCAACTACAACCCCGT CCCTCAAGAGTCGAGTACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCA GTCTCCCTGAAGTGAAGTCTGTGACCGCCCGGACACGGCTGTG TATTACTGTGCGAGACTGGGGCCCTTTGATGCTTTTGATATCTGGG GCCAAGGGACAATGGTACCCTGTCTTTCAGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCTTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCCTTGGGGGGC ACAGCGCCCTGGGCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGG TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACAC CTTCCGGCTGTCTCAGACTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGC GTGGTACCCTGCCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTACATCT GCAACGTGAATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGCCAAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAACCTGGGGGGCCCGTCACTTCTCTTCCCGCCAA AACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTCAAC TGATACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGC GGGAGGACAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAC CGTCTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAC GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC ATCCCGGATGAGTGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGACGGGAGAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGAAAGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTA
166	Нуклеотидная последовательность 3С3 L1 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTACCATCACTTGTGGGGCAGTCAAGGTATTAGCAG CTGGTTCAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGAGAAAAGCCCTAAGTCC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGGCAACTTATTAAGTCCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA GAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAGCA GACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCACATCAGG GCCTGAGCTCGCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
167	Нуклеотидная последовательность 3С3 L2 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)	GAAATTTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGGTGTTAGCAG CTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGGCTC CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGT TCAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG

	Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGC AACTGGCACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCCAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGAC TACGAGAAACACAAGTCTACGCCCTGGCAGTACCCATCAGGGCC TGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
168	Нуклеотидная последовательность 2G6 (VH)	CAGGTTACGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTGGTCCAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACTTTGAGTGA CTATGGCATGCACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAG TGGGTGACAGTATCTGGTATGATGGAAGTAATAAATTCTATGTAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATCCAAGAA CACGTTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCAGAGGGGGACGTCTAGCAACAGGTCACCTCT ACTACGTTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGACACGGTCAACCCTCTC CTCA
169	Нуклеотидная последовательность 2G6 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGGTATTAGCAG CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGAGAAAGCCCTAAGTCC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
170	Нуклеотидная последовательность 2G6 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CAGGTTACGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTGGTCCAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACTTTGAGTGA CTATGGCATGCACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAG TGGGTGACAGTATCTGGTATGATGGAAGTAATAAATTCTATGTAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATCCAAGAA CACGTTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCAGAGGGGGACGTCTAGCAACAGGTCACCTCT ACTACGTTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGACACGGTCAACCCTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGC TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCAGACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGGCG TCTGACAGCGGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACT TCGGCACCCAGACTACACTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTCTCGAGTGC CCACCGTGCCAGCACCTCTGGCAGGACCGTCACTCTTCTCTCT TCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGA GGTCAAGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTC CAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAG CGTCTCACCGTTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTTCCAAACAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACAC CCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAACTACAAGACCACACCTCC CATGCTGGAAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGACGCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCGAGAAAGCCTCTC CCTGCTCCGGGTA
171	Нуклеотидная последовательность 2G6 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGGTATTAGCAG CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGAGAAAGCCCTAAGTCC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT

	Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATACTGCCAACAGTATAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAGCTGGAGATCAAA GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTAATAAC TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCC TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAACAACAAGTCTACGCCTGCCAGTCAACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
172	Нуклеотидная последовательность 8A6 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTCACTTCAAGTAG CTATGGCATGCAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATAAATACTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGAAAATCCAAAGAA CACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGCGGTCTTATGGTTCGGGGTCTTTCT ACTACGGTATGGACGCTCGGGGCCAAGGGACCACGGTCCAC CGTCTCCTCA
173	Нуклеотидная последовательность 8A6 (VL)	CCCATCCAGTTCAACCCACTCTCCATCCTCCCTCTCTGCATCTCTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTCCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCTTAAGTTC CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAAGTGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTAAGTCTCAACAGTTTAA AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAGCTGGAGATCAAA
174	Нуклеотидная последовательность 8A6 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTCACTTCAAGTAG CTATGGCATGCAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAAGTAATAAATACTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGAAAATCCAAAGAA CACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGCGGTCTTATGGTTCGGGGTCTTTCT ACTACGGTATGGACGCTCGGGGCCAAGGGACCAGGTCACCCTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCGCCTGC TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGGCC TCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTCCCTCCAGCAACT TCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTGTCGAGTGC CCACCGTCCAGCACCCTGTGGCAGGACCTCAGTCTTCTCT TCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGA GGTACCGTGGTGGTGGAGCGTGGCCAGCAAGACCCCGAGGTC CAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCAGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAG CGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGAAGGTCTCCAAACAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCGAGAAACCAGGTGTACAC CCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGGCAATGGGAGCGGGAGAACAACTACAAGACCACCTCC CATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGAGGGGAACGCTCTCTCATGTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGGCTCTC CCTGTCTCCGGTAAA
175	Нуклеотидная последовательность 8A6	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTCCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCTAAGTTC

	(полноразмерной легкой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCACCTTATCTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAACAGGACAGGACAGCAAAGGACACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCATCAGCGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
176	Нуклеотидная последовательность 9G7 (VH)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCGTCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATTAAGCAAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACTCTCAAGAGATGATTCAAAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCACCCAGGACACAGCCGTGATTACTGTACCACAGGGCAGCTGATCCCTTACTCCTACTACTACGGTATGGAGCTCTGGGGCCAAAGGACCTCGGTCAACCTCTCCTCA
177	Нуклеотидная последовательность 9G7 (VL1)	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTTAGCAGCAGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAAGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGACGCTTCCGGCAAGGACCAAGGTGGAATCAAA
178	Нуклеотидная последовательность 9G7 (VL2)	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTTAGCAGCAGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGAGAAGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTATGGTAGCTCACCGTACCTTCCGGCAAGGACACGACTGGAGATTA
179	Нуклеотидная последовательность 9G7 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCGTCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATTAAGCAAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACTCTCAAGAGATGATTCAAAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCACCCAGGACACAGCCGTGATTACTGTACCACAGGGCAGCTGATCCCTTACTCCTACTACTACGGTATGGAGCTCTGGGGCCAAAGGACCTCGGTCAACCTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCATCCGTCTTCCCGCTGGCGCCCCTGCTCCAGGAGCCTCCGAGAGCAGCGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCATCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGACCATCAGTCTCCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGGAAGACCCCAGGTTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGGAGGAGTTCACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGATCAAGTGCAGGTTCCAAACAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGACGCCCGAGAGCCAGGTT

		<p>GTACACCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC  AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCG  TGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC  GCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGG  CTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCAT  GCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCCTACACACAGAAGAG  CCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAT</p>
180	<p>Нуклеотидная  последовательность 9G7 L2  (полноразмерной легкой цепи  дикого типа)</p> <p>Последовательность,  кодирующая константный  участок, подчеркнута</p>	<p>GAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAG  GGGAAAGAGCCACCCCTCCTCGCAGGGCCAGTCAAGTGTACCAG  CAGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGAGA  GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG  CAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAT  GGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCCAAAGGACAGACTGGAGATTA  AACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGA  TGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAAAT  AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACG  CCCTCCAATCGGGTAATCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA  GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATC  AGGGCCTGAGCTCGCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG  T</p>
181	<p>Нуклеотидная  последовательность 9G7 L1  (полноразмерной легкой цепи  дикого типа)</p> <p>Последовательность,  кодирующая константный  участок, подчеркнута</p>	<p>GAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAG  GGGAAAGAGCCACCCCTCCTCGCAGGGCCAGTCAAGTGTACCAG  CAGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGAGA  GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG  CAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAT  GGTAGCTCACCGTGGAGCTTCGGCCAAAGGACAAAGTGGAAATCA  AACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGA  TGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAAAT  AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACG  CCCTCCAATCGGGTAATCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA  GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATC  AGGGCCTGAGCTCGCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG  T</p>
182	<p>Нуклеотидная  последовательность 14E3 (VH)</p>	<p>CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG  AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGG  TTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGTGGAG  TGGATTGGAGAAATCAATCATAGTGGAAACACCTACTACAACCCGT  CCCTCAAGAGTCCGCTCACCATATCAGTAGACAGCTCCAAGAACCA  GTTATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTG  TATTACTGTGCGAGATTGGGAGTAATGATGCTTTTGATATCTGGG  GCCAAGGACAATGGTCAACCTCTCTCA</p>
183	<p>Нуклеотидная  последовательность 14E3 (VL)</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG  GAGACAGAGTCAACATCACTTGTGGGGCAGTCAAGGTATTAGCAG  CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGAGAAAGCCCTAAGTCC  CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGT  TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG  CCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAT  AGTTACCCCTCCGAGTTCGGCCAAAGGACCAAGGTGGAATCAA</p>
184	<p>Нуклеотидная  последовательность 14E3  (полноразмерной тяжелой цепи  дикого типа)</p>	<p>CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG  AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGG  TTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGTGGAG  TGGATTGGAGAAATCAATCATAGTGGAAACACCTACTACAACCCGT  CCCTCAAGAGTCCGCTCACCATATCAGTAGACAGCTCCAAGAACCA  GTTATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTG  TATTACTGTGCGAGATTGGGAGTAATGATGCTTTTGATATCTGGG</p>

	Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	<p>GCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAAGCCTCCACCAAGGGCCC  ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG  TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACAC  CTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT  GCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAAGAGAGT  TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA  GCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA  AACCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATG  CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAAC  TGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC  GGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCAC  CGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG  GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA  AAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCC  ATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG  GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA  ATGGGACGGGAGAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGA  CTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG  AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG  AGGCTTGCACAACCACTACAGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCC  GGTAAA</p>
185	Нуклеотидная последовательность 14E3 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAG  GAGACAGAGTACCATCACTTGTGGGGCAGTCAAGGTATTAGCAG  CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCTAAGTCC  CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT  TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACATCAGCAG  CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAT  AGTTACCCCTCCGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAC  GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGA  GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAAC  TTCTATCCAGAGAGGGCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCC  TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAA  GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA  GACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGG  GCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGGCTTCAACAGGGGAGGTGT</p>
186	Нуклеотидная последовательность 19H8 (VH)	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTGGTCCAGCCTGGGA  GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGACGGCTGGATTCACCTTCAGTAA  CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAG  TGATGGCAGTTATATGGTATGGTGGAAAGTAAATAATCTATGCAG  ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAA  CTCGCTGTCTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  GTGATTAAGTGTGCGAGAGGGGGGCTATGGTTCGGGGAGTCTACT  ACTACGGTATGGACGCTTGGGGCCAGGGACACCGGTCAAC  CGTCTCCTCA</p>
187	Нуклеотидная последовательность 19H8 (VL1)	<p>GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG  GAGACAGAGTACCATCACTTGCAGGGCAAGTCAAGGCATTAGCAG  TGCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGTTC  CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT  TCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACATCAGCAG  CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAAT  AGTTACCCCTCAGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAC</p>
188	Нуклеотидная последовательность 19H8 (VL2)	<p>GAAATGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAG  GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTAGCAG  CTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTC  CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGT  TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACATCAGCAG</p>

		CCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGC AACTGGCCGCTCACTTTCGGCCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
189	Нуклеотидная последовательность 19Н8 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAA CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAG TGGATGGCAGTATATGGTATGGTGGAAAGTAAATAATCTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAAGAA CTCGCTGTCTGTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCAGAGGGGGGGCTATGGTTCGGGGAGTCTACT ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAAGCTCACCGTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCCGCTGC TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCAGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGGCG TCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACT TCGGCACCCAGACTACACTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAA CACCAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAATGTTGTGCAGTGC CCACCGTGCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCT TCCCCCAAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTACCGTGCCTGGTGGAGCTGAGCCAGAAAGACCCGAGGTGTC CAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA CGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCAGCCCATCGAGAAA CCATCTCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAAACCAAGGTGACAC CCTGCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACGCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTACCCAGCGCATCGCGTGGAGT GGGAGGCAATGGGAGCCGGAGAACACTACAAGACCACCTCC CATGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGGCCTCTC CCTGTCTCCGGTAAA
190	Нуклеотидная последовательность 19Н8 L1 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCAACATCACTTCCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG TGCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGTCCCTAAGTTC CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTTAAT AGTTACCCTCAGACGTTCCGGCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCAGCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTGTGTGCCTGTGAATAAC TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCC TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGG GCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
191	Нуклеотидная последовательность 19Н8 L2 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	GAATTTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAG CTACTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTC CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGT TCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGCAGTACG AACTGGCCGCTCACTTTCCGGCAGGGACCAAGGTGGAGATCAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCAGCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTGTGTGCCTGTGAATAAC TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCC TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA

		GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
192	VH 3-33 (28F3, 18E10, 19D3, 2G6, 8A6, 19H8)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR
193	VH 3-10 (28F3, 8A6)	MVRG
194	VH 3-10 (9G7)	YYYG
195	VH 3-10 (19H8)	YYY
196	VH JH6 (28F3, 19H8)	YYGMDVWGQGTITVTVSS
197	VH JH6 (18E10, 2G6, 8A6)	YYGMDVWGQGTITVTVSS
198	VH JH6 (19D3, 9G7)	YYYYYGMVWGQGTITVTVSS
199	VH 6-19 (18E10)	IAVA
200	VH 3-16 (19D3)	DY
201	VH 4-34 (3C3, 14E3)	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSRGSTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV YYCAR
202	VH JH3 (3C3, 14E3)	DAFDIWGQGTMTVTVSS
203	VH 3-15 (9G7)	EVQLVESGGGLVKPAGSRLRSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLE WVGRISKRTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTT
204	VL L18 (28F3, 8A6, 19H8VK1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKL LIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFN NY
205	VL JK2 (28F3, 18E10, 19D3, 3C3VK1, 8A6, 2G6)	YTFGQGTKLEIK
206	VL JK2 (3C3VK2)	TFGQGTKLEIK
207	VL L15 (18E10, 19D3, 3C3VK1, 2G6, 14E3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPKAPKS LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SY
208	VL L20 (3C3VK2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRS NW
209	VL A27 (9G7VK1, 9G7VK2)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPKGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCOOY GSS
210	VL JK1 (9G7VK1)	WTFGQGTKVEIK
211	VL JK1 (14E3, 19H8VK1)	TFGQGTKVEIK
212	VL JK5 (9G7VK2)	ITFGQGTREIK
213	VL L6 (19H8VK2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRS NW
214	VL JK4 (19H8VK2)	LTFGGGTKVEIK
215	Эпитоп G1TR	QRPTGGPGCGPGRLLLTGTARCCRVHTTRCCRDYFGE
216	Эпитоп G1TR	QRPTGGPGCGPGRLLLTGT
217	Эпитоп G1TR (участок 1)	PTGGPGCGPGRLLLTGT
218	Эпитоп G1TR (участок 2)	CRDYPGEE
219	Пептидный линкер	PVGVV
220	С-конец тяжелой цепи	LSPGK
221	Константный участок G2	ASTKGFVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKTVVERKCCVECPCCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SRTKGPQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTKQKLSLSL SPG

222	Константный участок G2(C219S)	ASTKGFPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKSCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFM LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSL SPG
223	Модифицированный константный участок G2.g1	ASTKGFPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKSCVECPCCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLS LSPG
224	Модифицированный константный участок G2.g1.1	ASTKGFPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKSCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSL SPG
225	Модифицированный константный участок G2(C219S).g1	ASTKGFPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKSCVECPCCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLS LSPG
226	Модифицированный константный участок G2(C219S).g1.1	ASTKGFPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKSCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSL SPG
15	28F3 (VH + G2) или 28F3-IgG2	SEQ ID NO: 15
227	28F3 (VH + G2(C219S)) или 28F3-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGDIYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGFPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSPG
228	28F3 (VH + G2.g1) или 28F3-IgG2-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGDIYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGFPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKE

		YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTKQKLSLSLSPG
229	28F3 (VH + G2.g1.1) или 28F3-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYVYGMVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTKQKLSLSLSPG
230	28F3 (VH + G2(C219S).g1) или 28F3-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYVYGMVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTKQKLSLSLSPG
231	28F3 (VH + G2(C219S).g1.1) или 28F3-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYVYGMVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTKQKLSLSLSPG
28	19D3 (VH + G2) или 19D3-IgG2	SEQ ID NO: 28
232	19D3 (VH + G2(C219S)) или 19D3-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLEWVAVIWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDYVYVMDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTKQKLSLSLSPG
233	19D3 (VH + G2.g1) или 19D3-IgG2-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLEWVAVIWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDYVYVMDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTKQKLSLSLSPG
234	19D3 (VH + G2.g1.1) или 19D3-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLEWVAVIWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDYVYVMDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTKQKLSLSLSPG

		LYSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCP PCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTI S KAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
235	19D3 (VH + G2(C219S).g1) или 19D3-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCARGGQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
236	19D3 (VH + G2(C219S).g1.1) или 19D3-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCARGGQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCP PCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTI S KAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
41	18E10 (VH + G2) или 18E10-IgG2	SEQ ID NO: 41
237	18E10 (VH + G2(C219S)) или 18E10-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCP PCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTI S KTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
238	18E10 (VH + G2.g1) или 18E10-IgG2-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
239	18E10 (VH + G2.g1.1) или 18E10-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCP PCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTI S KAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG

240	18E10 (VH + G2(C219S).g1) или 18E10-IgG2-C219S-IgG1	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE  WVAWIWYAGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA  VYYCARGGRIAVAFYYSDMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCS  RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  LYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRSKVECP  PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTV  DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG</p>
241	18E10 (VH + G2(C219S).g1.1) или 18E10-IgG2-C219S-IgG1.1	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE  WVAWIWYAGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA  VYYCARGGRIAVAFYYSDMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCS  RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  LYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRSKVECP  PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  CKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTV  DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG</p>
242	3C3 (VH + G2) или 3C3-IgG2	<p>QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWWTWIRQPPGKGLE  WIGKINHSGNTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAV  YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRSKVECP  VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEVQFNWYVD  GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK  GLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFI  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQ  QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG</p>
243	3C3 (VH + G2(C219S)) или 3C3-IgG2-C219S	<p>QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWWTWIRQPPGKGLE  WIGKINHSGNTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAV  YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRSKVECP  VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEVQFNWYVD  GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK  GLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFI  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQ  QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG</p>
244	3C3 (VH + G2.g1) или 3C3-IgG2-IgG1	<p>QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWWTWIRQPPGKGLE  WIGKINHSGNTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAV  YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRSKVECP  LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYV  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  KALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW  QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG</p>
245	3C3 (VH + G2.g1.1) или 3C3-IgG2-IgG1.1	<p>QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWWTWIRQPPGKGLE  WIGKINHSGNTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAV  YYCARLGAFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRSKVECP  VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYV  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  ALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFI</p>

		<u>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSQVMHEALHNYTQKLSLSLSPG</u>
246	3C3 (VH + G2(C219S).g1) или 3C3-IgG2-C219S-IgG1	<u>QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCVAVYGGFSFGYYWTWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGKINHSGNTNYNPSLKSRTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV</u> <u>YYCARLGAFDAFDIWGQGMVTVSSASTKGFSPVFLAPCSRSTSES</u> <u>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS</u> <u>VVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVCCPPCPAPE</u> <u>LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG</u> <u>FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QGNVFSQVMHEALHNYTQKLSLSLSPG</u>
247	3C3 (VH + G2(C219S).g1.1) или 3C3-IgG2-C219S-IgG1.1	<u>QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCVAVYGGFSFGYYWTWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGKINHSGNTNYNPSLKSRTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV</u> <u>YYCARLGAFDAFDIWGQGMVTVSSASTKGFSPVFLAPCSRSTSES</u> <u>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS</u> <u>VVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVCCPPCPAPE</u> <u>VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSQVMHEALHNYTQKLSLSLSPG</u>
248	2G6 (VH + G2) или 2G6-IgG2	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFLISDYGMHWVRQAPGKGLE</u> <u>WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTA</u> <u>VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGFSPVFLAPC</u> <u>SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS</u> <u>GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVCC</u> <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKGLPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL</u> <u>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQGNVFSQVMHEALHNYTQKLSLSLSPG</u>
249	2G6 (VH + G2(C219S)) или 2G6-IgG2-C219S	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFLISDYGMHWVRQAPGKGLE</u> <u>WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTA</u> <u>VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGFSPVFLAPC</u> <u>SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS</u> <u>GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVCC</u> <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKGLPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL</u> <u>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQGNVFSQVMHEALHNYTQKLSLSLSPG</u>
250	2G6 (VH + G2.g1) или 2G6-IgG2-IgG1	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFLISDYGMHWVRQAPGKGLE</u> <u>WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTA</u> <u>VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGFSPVFLAPC</u> <u>SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS</u> <u>GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVCC</u> <u>PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE</u> <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE</u> <u>YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL</u> <u>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL</u> <u>TVDKSRWQGNVFSQVMHEALHNYTQKLSLSLSPG</u>
251	2G6 (VH + G2.g1.1) или 2G6-IgG2-IgG1.1	<u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFLISDYGMHWVRQAPGKGLE</u> <u>WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTA</u> <u>VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGFSPVFLAPC</u> <u>SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS</u> <u>GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVCC</u> <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY</u>

		KCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
252	2G6 (VH + G2(C219S).g1) или 2G6-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTLSDYGMHWVRQAPGKGLE WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTA VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTRVDKTVVERKSCVEC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSL LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
253	2G6 (VH + G2(C219S).g1.1) или 2G6-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTLSDYGMHWVRQAPGKGLE WVTVIWYDGSNKFYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTA VYYCARGGRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTRVDKTVVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
86	8A6 (VH + G2) или 8A6-IgG2	SEQ ID NO: 86
254	8A6 (VH + G2(C219S)) или 8A6-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGFTTSSYGMQWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGLMVRGLFYGMVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTRVDKTVVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTI SRTKQGPPEPQVYTLPPSREEMTKNOVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
255	8A6 (VH + G2.g1) или 8A6 -IgG2-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGFTTSSYGMQWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGLMVRGLFYGMVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTRVDKTVVERKSCVEC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSL LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
256	8A6 (VH + G2.g1.1) или 8A6 -IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGFTTSSYGMQWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGLMVRGLFYGMVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTRVDKTVVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
257	8A6 (VH + G2(C219S).g1) или 8A6-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGFTTSSYGMQWVRQAPGKGLE WVAWIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGLMVRGLFYGMVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

		GLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPI EKTISAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
258	8A6 (VH + G2(C219S).g1.1) или 8A6-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTTSSYGMQWVRQAPGKGLE WVAVIWYEGSNKYADSVKGRFTISREMSKNTLYLQMNLSRAEDTA VYFCARGGLMVRGLFYGMVDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECP PCPAAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPSSIEKTI SAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
259	9G7 (VH + G2) или 9G7-IgG2	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYGYGMVDVWGGQTSVTVSSASTKGPSVFPFLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS SGLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVE CPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPI EKTISAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
260	9G7 (VH + G2(C219S)) или 9G7-IgG2-C219S	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYGYGMVDVWGGQTSVTVSSASTKGPSVFPFLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS SGLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVE CPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPI EKTISAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
261	9G7 (VH + G2.g1) или 9G7-IgG2-IgG1	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYGYGMVDVWGGQTSVTVSSASTKGPSVFPFLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS SGLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPI EKTISAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
262	9G7 (VH + G2.g1.1) или 9G7-IgG2-IgG1.1	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYGYGMVDVWGGQTSVTVSSASTKGPSVFPFLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS SGLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVE CPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPSSIEKTI SAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
263	9G7 (VH + G2(C219S).g1) или 9G7-IgG2-C219S-IgG1	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLHTE TAVYYCTTGQLIPYSYGYGMVDVWGGQTSVTVSSASTKGPSVFPFLAP

		CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVE CPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPPEPVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
264	9G7 (VH + G2(C219S).g1.1) или 9G7-IgG2-C219S-IgG1.1	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTTSTVWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTED TAVYYCTGQLIPYSYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFLPAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVE CPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPPEPVYTLPPSREEMTKNQV LTCVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
265	14E3 (VH + G2) или 14E3-IgG2	QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WIGGINHSGNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWQGTMTVTVSSASTKGPSVFLPAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPPEPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
266	14E3 (VH + G2(C219S)) или 14E3-IgG2-C219S	QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WIGGINHSGNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWQGTMTVTVSSASTKGPSVFLPAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPPEPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
267	14E3 (VH + G2.g1) или 14E3-IgG2-IgG1	QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WIGGINHSGNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWQGTMTVTVSSASTKGPSVFLPAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTI SKAKGQPPEPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
268	14E3 (VH + G2.g1.1) или 14E3-IgG2-IgG1.1	QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WIGGINHSGNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV YYCARFGSNDADFIDWQGTMTVTVSSASTKGPSVFLPAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPPEPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
269	14E3 (VH + G2(C219S).g1) или 14E3-IgG2-C219S-IgG1	QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WIGGINHSGNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAV

		YYCARFGSNDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECPCCPAPF LLGGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
270	14E3 (VH + G2(C219S).g1.1) или 14E3-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWWSIRQPPGKGLE WIGEINHSCNTYYNPSLKSRTVTSVDTSKNQLSLKLSSTAAADTAV YYCARFGSNDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECPCCPAPP VAGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQ QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
131	19H8 (VH + G2) или 19H8-IgG2	SEQ ID NO: 131
271	19H8 (VH + G2(C219S)) или 19H8-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTA VYYCARGGAMVRGVVYVYGMVWVGGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTIVHVDWLNKKEY KCKVSNKGLPAPIEKTI SRTKQGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
272	19H8 (VH + G2.g1) или 19H8-IgG2-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTA VYYCARGGAMVRGVVYVYGMVWVGGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECP PCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKKEY YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
273	19H8 (VH + G2.g1.1) или 19H8-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTA VYYCARGGAMVRGVVYVYGMVWVGGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKKEY KCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
274	19H8 (VH + G2(C219S).g1) или 19H8-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTA VYYCARGGAMVRGVVYVYGMVWVGGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKSCVECP PCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKKEY YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL

		LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
275	19H8 (VH + G2(C219S).g1.1) или 19H8-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLE WMAVIWYGGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTA VYYCARGGAMVRGVYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLPAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
276	С-конец тяжелой цепи	LSPG
277	-	
278	CH1 человеческого IgG1 дикого типа	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKTV
279	CH1 человеческого IgG2 дикого типа	ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTV
280	CH2 человеческого IgG1 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTI SKAK
281	CH2 человеческого IgG1 с A330S/P331S	PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP SSIEKTI SKAK
282	CH3 человеческого IgG1 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
283	IgG1-IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKTVVERKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
284	IgG1-IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKTVVERKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
285	IgG1-IgG2-IgG1.1f	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKTVVERKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
286	IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKTVVERKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL

		PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
287	IgG1-IgG2-IgG1f2	ASTKGPVSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKVERKCCVECPCCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
288	IgG1-IgG2(C219S)-IgG1f2	ASTKGPVSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKVERKCCVECPCCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
289	IgG2-IgG1f2	ASTKGPVSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVKRCVCECPCCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
290	IgG2(C219S)-IgG1f2	ASTKGPVSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVKRCVCECPCCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
291	Шарнир человеческого IgG2 WT	ERKCCVECPCCPAPVAG
292	Шарнир человеческого IgG2 с C219S	ERKSCVECPCCPAPVAG
293	Шарнир IgG2/IgG1	ERKCCVECPCCPAP <u>ELLGG</u>
294	Шарнир IgG2 (C219S)/IgG1	ERKSCVECPCCPAP <u>ELLGG</u>
295	Шарнир человеческого IgG1 дикого типа	EPKSCDKTHTCPCPAP <u>ELLGG</u>
296	Шарнир IgG1.1 (L234A/L235E/G237A)	EPKSCDKTHTCPCPAP <u>AEAGA</u>
297	CH2 человеческого IgG2 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP APIEKTIISKTK
298	CH3 человеческого IgG2 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPMLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
299	С-концевой C <sub>H1</sub> IgG1 (такой же для IgG3 (17-15-15-15), igG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) и IgG4	VDKRV
300	С-концевой C <sub>H1</sub> IgG2	VDKTV
301	Верхний шарнир IgG1	EPKSCDKTHT

302	Верхний шарнир IgG3 (17-15-15) (такой же для IgG3 (17-15-15) и IgG3 (17-15))	ELKTP LGDTTHT
303	Верхний шарнир IgG3 (15-15-15) (такой же для IgG3(15))	EPKS
304	Верхний шарнир IgG4	ESKYGFP
305	Средний шарнир IgG1	CPPCP
306	Средний шарнир IgG2	CCVECPCP
307	Средний шарнир IgG3 (17-15-15)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub>
308	Средний шарнир IgG3 (17-15-15)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>
309	Средний шарнир IgG3 (17-15)	CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
310	Средний шарнир IgG3 (15-15-15)	CDTPPPCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>
311	Средний шарнир IgG3 (15)	CDTPPPCPRCP
312	Средний шарнир IgG4	CPSCP
313	Нижний шарнир IgG1 (такой же для IgG3 (17-15-15-15), IgG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) и IgG4)	APELLGG
314	Нижний шарнир IgG2	APPVAG
315	Сигнальная последовательность VH 28F3 (такая же для 18E10, 19D3, 19H8, 6G10)	MEFGLSWVFLVALLRGVQC
316	Сигнальная последовательность VH 28F3 (нуклеотидная последовательность)	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTCTTTTAAAGAGGTGTCCAGTGT
317	Сигнальная последовательность VL 28F3 (такая же для 18E10, 8A6, 19H8VL1, 6G10)	MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC
318	Сигнальная последовательность VL 28F3 (нуклеотидная последовательность)	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGTCTGCTGCTGTGGCTCCAGGTGCCAGAT
319	Сигнальная последовательность VL 19D3	MRVLAQLLGLLLCFPGARC
320	Сигнальная последовательность VL 19D3 (нуклеотидная последовательность)	ATGAGGGTCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTGTTCCTCCAGGTGCCAGATGT
321	Сигнальная последовательность VH 3C3 (такая же для 14E3)	MKHLWFFLLVAAPRWVLS
322	Сигнальная последовательность VH 3C3 (нуклеотидная последовательность)	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGTCTGTCC
323	Сигнальная последовательность VL 3C3 (такая же для 14E3)	MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC
324	Сигнальная последовательность VL 3C3 (нуклеотидная последовательность)	ATGGACATGAGGGTCTCGCTCAGCTCCTGGGGTCTGCTGCTGTTCCTCCAGGTGCCAGATGT
325	Сигнальная последовательность VL2 3C3 (такая же для VL2 19H8)	MEAPAQLLFLLLWLPDTTG
326	Сигнальная последовательность VL2 3C3 (нуклеотидная последовательность)	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA
327	Сигнальная последовательность VH 8A6	MEFGLNWFVFLVALLRGVQC

328	Сигнальная последовательность VH 8A6 (нуклеотидная последовательность)	ATGGAGTTTGGGCTGAAGTGGGTTTTCTCCTGCTGCTCTTTAAGAGGTGTCCAGTGT
329	Сигнальная последовательность VH 9G7	MEFGLSWIFLAAILKGVQC
330	Сигнальная последовательность VH 9G7 (нуклеотидная последовательность)	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATTTCTCCTGCTGCTATTTAAAGGTGTCCAGTGT
331	Сигнальная последовательность VL1 и VL2 9G7	METPAQLLFLLLLWLPDITG
332	Сигнальная последовательность VL1 и VL2 9G7 (нуклеотидная последовательность)	ATGGAACCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA
333	Сигнальная последовательность VH 14E3	MKHLWFFLLVAAPRWLS
334	Сигнальная последовательность VH 14E3 (нуклеотидная последовательность)	ATGAAACACCTGTGGTICTCTCCTCCTGCTGGCAGCTCCAGATGGGTCTGTCC
335	6G10 (VH)	QVQLVESGGDVVQPPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLIEWAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSS
336	6G10 (VL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFGQGTKLEIK
337	6G10 (полноразмерная тяжелая цепь дикого типа) Константный участок подчеркнут	QVQLVESGGDVVQPPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLIEWAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHPKPSNTKVDKTVRERKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SRTKGPQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
338	6G10 (полноразмерная легкая цепь дикого типа) Константный участок подчеркнут	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
339	6G10.IgG1 (VH + IgG1)	QVQLVESGGDVVQPPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLIEWAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
340	6G10.IgG1.1 (VH + IgG1.1)	QVQLVESGGDVVQPPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLIEWAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLN

		GKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
341	6G10-IgG1 (VL + CL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSALAWYQQKPKGKAPKL LIYDASSLESVPSRFSGSGSDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQFN SYFYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLASKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
342	CDR1 VH 6G10	TYGMH
343	CDR2 VH 6G10	VTWYAGSNKIFYADSVKGG
344	CDR3 VH 6G10	GGSMVRGLYYGMDV
345	CDR1 VL 6G10	RASQGISSALA
346	CDR2 VL 6G10	DASSLES
347	CDR3 VL 6G10	QQFNYSYPT
337	6G10 (VH + G2) или 6G10-IgG2	SEQ ID NO: 337
348	6G10 (VH + G2(C219S)) или 6G10-IgG2-C219S	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFP LAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKSCVEC PPCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLVTVHLDWLNKGEY KCKVSNKGLPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
349	6G10 (VH + G2.g1) или 6G10-IgG2-IgG1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFP LAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKSCVEC PPCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV VFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLVTVHLDWLNKGEY YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
350	6G10 (VH + G2.g1.1) или 6G10-IgG2-IgG1.1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFP LAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKSCVEC PPCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLVTVHLDWLNKGEY KCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
351	6G10 (VH + G2(C219S).g1) или 6G10-IgG2-C219S-IgG1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFP LAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKSCVEC PPCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV VFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLVTVHLDWLNKGEY YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
352	6G10 (VH + G2(C219S).g1.1) или 6G10-IgG2-C219S-IgG1.1	QVQLVESGGDVVQPGRSRLRSCAASGFTTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAVTWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA

		VYYCARGGSMVRGLYYGMDVWGQGTVTTVSSASTKGPSVFFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVFSSNFGQTQTYTENVHDKPSNTKVDKTVRKSQVCEC PPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG
353	Нуклеотидная последовательность 6G10 (VH)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAC CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTACATGGTATGCTGGAAGTAATAAATTTTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCAGAA CACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTAGTATGGTTCGGGGACTTTATT ATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACCAGGTCACCGTCTC CTCA
354	Нуклеотидная последовательность 6G10 (VL)	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCATAAGCTC CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAAT AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAGCTGGAGATCAA
355	Нуклеотидная последовательность 6G10 (полноразмерной тяжелой цепи дикого типа)  Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAC CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGTTACATGGTATGCTGGAAGTAATAAATTTTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCAGAA CACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTAGTATGGTTCGGGGACTTTATT ATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACCAGGTCACCGTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCTGC TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGGCC TCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCA GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACT TCGGCACCCAGACTACACTGCAACGTAGATCACAGCCCAGCAA CACCAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTGTCGAGTGC CCACCGTCCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTCTTCTCT TCCCCCAAACCCAAAGGACCCCTCATGATCTCCCGGACCCTGA GGTACGTGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAGACCCGAGGTC CAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAG CGTCTCACCGTTGTGACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTCAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCAGCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAACCAAAAGGACGCCCCGAGAACCAAGGTGTACAC CCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGACGGGAGAACTACAAGACCACACTCC CATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACCGCAGAAGGCCTCTC CCTGTCTCCGGTAAA
356	Нуклеотидная последовательность 6G10 (полноразмерной легкой цепи дикого типа)	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCATAAGCTC CTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG

	Последовательность, кодирующая константный участок, подчеркнута	CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCACCTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTACACTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTCGGAGTCAACCCATCAGGCGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGTGT
357	28F3 (VH) (SEQ ID NO: 13) с сигнальным пептидом Сигнальный пептид подчеркнут	MRAWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAIVWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVVYCARGGSMVRGDYVYGMVWQGTTVT VSS
358	28F3 (VL) (SEQ ID NO: 14) с сигнальным пептидом Сигнальный пептид подчеркнут	MRAWIFFLLCLAGRALAAIQLTQSPSSLSASVGDVITICTRASQGISALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESVPSRFRSGSGSGDTFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNISYPYTFGGQTKLEIK
359	Нуклеотидная последовательность 28F3 (VH) с сигнальным пептидом  SEQ ID NO: 147 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид  Последовательность, кодирующая сигнальный пептид, подчеркнута	atgagggcttggatcttcttcttctgctctgctgctggcgggagagagcctcgcacAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTGTGGATTCAACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAGTAAATAATATATGTCAGACTCCGTGAAGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATCC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCTGTGTATTAAGTGTGCGAGAGGGGGGAGTATGGTTGGGGGGA CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACCAACGGTCAAC GTCTCCTCA
360	Нуклеотидная последовательность 28F3 (VL) с сигнальным пептидом  SEQ ID NO: 148 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид  Последовательность, кодирующая сигнальный пептид, подчеркнута	atgagggcttggatcttcttcttctgctctgctgctggcgggagagagcctcgcacAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTGTGGATTCAACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGAGTAAATAATATATGTCAGACTCCGTGAAGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATCC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCTGTGTATTAAGTGTGCGAGAGGGGGGAGTATGGTTGGGGGGA CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACCAACGGTCAAC GTCTCCTCA
361	28F3.IgG1 (VH + IgG1) (SEQ ID NO: 17) с сигнальным пептидом  Сигнальный пептид и константный участок подчеркнуты	MRAWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAIVWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVVYCARGGSMVRGDYVYGMVWQGTTVT VSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCMVHEALHNHYTQKLSLSLEG
362	28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1) (SEQ ID NO: 18) с сигнальным пептидом  Сигнальный пептид и константный участок подчеркнуты	MRAWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAIVWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVVYCARGGSMVRGDYVYGMVWQGTTVT VSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCMVHEALHNHYTQKLSLSLEG

		YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHY TQKLSLSFG
363	<p>Нуклеотидная последовательность 28F3.IgG1 (VH + IgG1) с сигнальным пептидом</p> <p>SEQ ID NO: 151 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид</p> <p>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид, подчеркнута</p>	<p><u>atgagggcttggatcttcttctgctctgctggccgggagagc</u>  <u>gctcgcaaggtgcagctgggtggagctctggggaggcggtgcca</u>  <u>gcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcacc</u>  <u>ttcagtagctatggcatgcaactgggtccgcaggctccaggcaagg</u>  <u>ggctggagtggtggcagttatattggtatgaaggaagtaataaata</u>  <u>ttatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaat</u>  <u>tccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagg</u>  <u>acagcgtgtgtattactgtgcgagagggggagatgggttcgggg</u>  <u>ggactactactacggtatggcgtctggggccaagggaaccaagtc</u>  <u>accgtctcctcagctagccaaggccatcggtcttccccctgg</u>  <u>caacctctccaagagcactctgggggacagcggccctgggctg</u>  <u>cctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaac</u>  <u>tcaggccctgaccagcggcgtgcaaccttccccggctgctctac</u>  <u>agtctcaggactctactccctcagcagcgtgtgacggtgcccc</u>  <u>cagcagctgggcaaccagacctacatctgcaactgaaatcacaag</u>  <u>ccagcaacccaaggtggaagagagttgagccaaaatctgtg</u>  <u>acaaaactcacacatgccaccgtgcccagcagcctgaaactcctggg</u>  <u>gggaccgtcagtetctctctcccccaaaacccaaggacaacctc</u>  <u>atgatctccccgacccctgaggtcacatcgctgggtggcagctga</u>  <u>gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgt</u>  <u>ggaggtgcataatgccaagacaaagccggggaggagcagtaacaac</u>  <u>agcagctaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaaccaggact</u>  <u>ggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccct</u>  <u>cccagccccatcgagaaaaacatctccaagccaaggcagccc</u>  <u>cgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccccggggagagatga</u>  <u>ccaagaaccaggtcagcctgacotgctgggtcaaaaggctctatcc</u>  <u>cagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcaagccggagaaac</u>  <u>aaactacaagcaacgcctccctgctggaactccgacggctcctct</u>  <u>tcctctatagcaagctcaccgtggaacagcaggtggcagcagg</u>  <u>gaacgtctctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccac</u>  <u>tacacgcagaagagcctctcctctccccgggtga</u></p>
364	<p>Нуклеотидная последовательность 28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1) с сигнальным пептидом</p> <p>SEQ ID NO: 152 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид</p> <p>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид, подчеркнута</p>	<p><u>atgagggcttggatcttcttctgctctgctggccgggagagc</u>  <u>gctcgcaaggtgcagc tgggtggagtc tggggaggc</u>  <u>gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tctgtgag</u>  <u>cgctggatt cacctcagc agctatggca tgcactgggt</u>  <u>ccgccaaggct</u>  <u>ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg</u>  <u>aaggaagtaa taaatattat gcagactccg tgaaggcccg</u>  <u>attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat</u>  <u>ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt</u>  <u>attactgtgc gagagggggg agtatggttc gggggacta</u>  <u>ctactacggt atggcgtct ggggccaagg gaccaagctc</u>  <u>accgtctcct cagctagcac caagggccca tcggtcttcc</u>  <u>ccctggcacc ctctccaag agcaacctctg ggggcaagc</u>  <u>ggccctgggc tgctgtgca aggactact ccccaagccg</u>  <u>gtgacgggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg</u>  <u>tgcaacctt cccgctgtc ctacagctct caggactcta</u>  <u>ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg</u>  <u>ggcaccaga cctacatctg caacgtgaaat cacaagccca</u>  <u>gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaatcttg</u>  <u>tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa</u>  <u>gccgaagggg cccctcagc ctctctctc cccccaaaac</u>  <u>ccaaggacac cctcatgac tcccggacc ctgaggtcac</u>  <u>atgctgggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc</u>  <u>aaagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg</u>  <u>ccaagacaaa gcccgggag gagcagtaaca acagcagta</u>  <u>ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg</u></p>

		ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccaag cagcatcgag aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgacca gaaccaggtc agcctgacct gcctggcaaa aggtctctat cccagcgaca tcgcccgtga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgca aacactaca cgcagaagag cctctccctg tccccgggt ga
365	28F3.IgG1 (VL+CL) (SEQ ID NO: 19) с сигнальным пептидом  Сигнальный пептид и константный участок подчеркнуты	MRAWIFFLLLAGRALAAIQLTQSPSSLSASVGRVTTTCRASQ GTSALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESQVPSRFRSGSGSTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FI FPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
366	Нуклеотидная последовательность 28F3.IgG1 (VL+CL) с сигнальным пептидом  SEQ ID NO: 153 с сигнальной последовательностью  Последовательность, кодирующая сигнальный пептид, подчеркнута	atgagggttgatcttcttctgctctgctggccggcgccgc cttggccgccaatccagttgaccagctctccatccctgctgctg atctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcaggc attagcagtgctttagcctggatcagcagaacacgggaaagctc ctaagctcctgatctatgatgcctccagttggaagtggggtccc atcaaggttcagcggcagtgatctgggacagatttcactctcacc atcagcagcctgcagcctgaagatttgcaacttattactgtcaac agtttaatagttaccgtaacactttggccaggggaccaagctgga gatcaaacgtacgggtgctgaccatctgctctctctcccacca ctgtatgagcagttgaaatctggaactgctctgttggtgctgctg tgaataacttctatcccagagagggcaaaagtaacagtggaagtgga taacgcctccaatcgggtaactcccaggaagtgctcaagagcag gacagcaagacagacactacagcctcagcagcaccctgacgctga gcaaacgagactcagagaaacacaagctcagcctgctgcaagtcac ccatcagggcctgagctcgcctgcacaagagcttcaacaggg gagagtgtag
367	Сигнальный пептид	MRAWIFFLLLAGRALA
368	Нуклеотидная последовательность сигнального пептида	atgagggttgatcttcttctgctctgctggccgggagagcgc tcgca
369	Нуклеотидная последовательность сигнального пептида	atgagggttgatcttcttctgctctgctggccggcgccgct tgcc
370	Фрагмент человеческого GITR	QRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTR
371	9G7 L1 (полноразмерная легкая цепь 1 дикого типа)  Константный участок подчеркнут	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPKGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVLNN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
372	Вырожденный CDR1 VH	SYGXH, в которой X представляет собой любую аминокислоту
373	Вырожденный CDR2 VH	VIWYX <sub>1</sub> GSNKX <sub>2</sub> YADSVKQ, в которой X <sub>1</sub> и X <sub>2</sub> представляют собой любые аминокислоты
374	Вырожденный CDR2 VH	VIWYX <sub>1</sub> GSNKX <sub>2</sub> YX <sub>3</sub> DSVKQ, в которой X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> и X <sub>3</sub> представляют собой любые аминокислоты
375	Вырожденный CDR3 VH	GGSX <sub>1</sub> VRGDYYYGMDV, в которой X <sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту
376	Вырожденный CDR3 VH	GGSX <sub>1</sub> VRGX <sub>2</sub> YYYGMDV, в которой X <sub>1</sub> и X <sub>2</sub> представляют собой любые аминокислоты
377	Вырожденный CDR3 VH	GG (6-7aa) MDVWYX <sub>1</sub> MDVW, в которой X <sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, и аминокислоты 6-7 представляют собой любые аминокислоты
378	Вырожденный CDR1 VL	RASQGISXLA, в которой X представляет собой любую аминокислоту
379	Вырожденный CDR1 VL	RASQG (2-3 aa) SX <sub>1</sub> LA, в которой X <sub>1</sub> представляет собой любую аминокислоту, и аминокислоты 2-3 представляют собой любые аминокислоты
380	Вырожденный CDR2 VL	DASSLXS, в которой X представляет собой любую аминокислоту
381	Вырожденный CDR3 VL	QQXNSYPT, в которой X представляет собой любую аминокислоту
382	Вырожденный CDR3 VL	QQX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> SX <sub>3</sub> PX <sub>4</sub> T, в которой X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> и X <sub>4</sub> представляют собой любые аминокислоты

В табл. 11 представлены последовательности зрелых вариабельных участков и тяжелых и легких цепей, а также там, где это указано, последовательности с сигнальными пептидами.

Эквиваленты.

Специалисту в данной области техники будет понятно или он будет способен определить множество эквивалентов, раскрытых в настоящем описании конкретных вариантов осуществления с использованием не более чем стандартных экспериментов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое связывается с человеческим индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR), содержащее последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно.

2. Антитело по п.1, причем антитело стимулирует противоопухолевую иммунную реакцию.

3. Антитело по п.1 или 2, причем антитело стимулирует Т-клеточную реакцию.

4. Антитело по любому из пп.1-3, причем антитело повышает продукцию IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих GITR Т-клетках.

5. Антитело по любому из пп.1-4, причем антитело повышает пролиферацию Т-клеток.

6. Антитело по пп.1-5, причем антитело не связывается с Fc-рецепторами.
7. Антитело по любому из пп.1-5, причем антитело связывается с одним или несколькими активирующими FcγR.
8. Антитело по любому из пп.1-7, причем антитело связывается с мембраносвязанным человеческим G1TR с K<sub>D</sub>, составляющей 1 нМ или менее при измерении по Скэтчарду.
9. Антитело по любому из пп.1-8, причем антитело связывается с растворимым человеческим G1TR с K<sub>D</sub>, составляющей 100 нМ или менее при измерении с помощью метода Biacore.
10. Антитело по любому из пп.1-9, причем антитело связывается с мембраносвязанным G1TR яванского макака с EC<sub>50</sub>, составляющей 10 нМ или менее при измерении с помощью метода FACS.
11. Антитело по любому из пп.1-10, причем антитело ингибирует связывание лиганда G1TR с G1TR с EC<sub>50</sub>, составляющей 1 мкг/мл или менее при измерении с помощью метода FACS.
12. Выделенное антитело, которое связывается с человеческим индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (G1TR) и содержит последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, по меньшей мере на 85% идентичных аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.
13. Антитело по п.12, причем переменные участки тяжелой и легкой цепей по меньшей мере на 90% идентичны переменным участкам тяжелой и легкой цепей аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.
14. Антитело по п.13, причем переменные участки тяжелой и легкой цепей по меньшей мере на 95% идентичны переменным участкам тяжелой и легкой цепей аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.
15. Антитело по п.14, причем переменные участки тяжелой и легкой цепей содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.
16. Антитело по любому из пп.1-15, в котором тяжелая и легкая цепи представляют собой полно-размерные тяжелые и легкие цепи.
17. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с человеческим индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (G1TR) и содержит последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичные аминокислотным последовательностям, которые выбраны из группы, состоящей из:
  - (a) SEQ ID NO: 15 и 16 соответственно;
  - (b) SEQ ID NO: 17 и 19 соответственно и
  - (c) SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно.
18. Антитело по п.17, в котором антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.
19. Антитело по п.17, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.
20. Антитело по п.17, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.
21. Антитело по любому из пп.1-20, причем антитело связывается с PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO: 217) и CRDYPGEE (SEQ ID NO: 218) в зрелом человеческом G1TR (SEQ ID NO: 4).
22. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-21, причем антитело связывается как с человеческим G1TR, так и с G1TR яванского макака.
23. Антитело по любому из пп.1-22, причем антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его варианта.
24. Антитело по п.23, причем антитело представляет собой антитело IgG1.
25. Антитело по п.23, причем антитело содержит Fc IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией.
26. Антитело по п.25, причем антитело содержит Fc IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией, который содержит следующие мутации: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.
27. Антитело по п.23, причем антитело содержит Fc, характеризующийся усиленным связыванием с активирующим FcγR.
28. Антитело по любому из пп.1-27, причем антитело представляет собой человеческое антитело.
29. Биспецифичная молекула, содержащая антитело по любому из пп.1-28.
30. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую и легкую цепи или их переменные участки антитела по любому из пп.1-28.
31. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.30.
32. Клетка, трансформированная (i) вектором экспрессии по п.31 или (ii) вектором экспрессии, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-28 и отдельный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела по

любому из пп.1-28.

33. Иммуноконъюгат, содержащий антитело, которое связывается с человеческим GITR по любому из пп.1-28.

34. Композиция для лечения рака, содержащая терапевтически эффективное количество антитела, которое связывается с человеческим GITR по любому из пп.1-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Набор для лечения рака, содержащий антитело по любому из пп.1-28 и инструкции к применению.

36. Способ получения антитела по любому из пп.1-28, включающий экспрессию антитела в клетке по п.32 и выделение антитела из клетки.

37. Применение антитела по любому из пп.1-28 для стимуляции антигенспецифичной Т-клеточной реакции.

38. Применение антитела по любому из пп.1-28 для активации или костимуляции эффекторной Т-клетки.

39. Применение антитела по любому из пп.1-28 для повышения продукции IL-2 и/или IFN- $\gamma$  в Т-клетке.

40. Применение антитела по любому из пп.1-28 для повышения пролиферации Т-клеток.

41. Применение антитела по любому из пп.1-28 для снижения количества регуляторных Т-клеток в опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

42. Применение антитела по любому из пп.1-28 для стимуляции иммунной реакции.

43. Применение по п.42, при котором субъект имеет опухоль и стимулируется иммунная реакция в отношении опухоли.

44. Применение антитела по любому из пп.1-28 для ингибирования роста опухолей.

45. Применение антитела по любому из пп.1-28 для лечения злокачественной опухоли.

46. Применение по п.45, при котором злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль толстой и прямой кишок, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль легкого, злокачественную опухоль желудка, герминогенную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль кожи, злокачественные новообразования центральной нервной системы, лимфомы, лейкозы, миелому, саркому или злокачественную опухоль, связанную с вирусом.

47. Применение по п.45 или 46, при котором злокачественная опухоль представляет собой метастазирующую злокачественную опухоль, невосприимчивую к лечению злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

48. Применение по любому из пп.41-47 вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

49. Применение по п.48, где одно или несколько дополнительных терапевтических средств представляют собой антитело к PD1, антитело к LAG-3, антитело к CTLA-4 или антитело к PD-L1.

50. Способ выявления наличия индуцируемого глюкокортикоидами TNF-рецептора (GITR) в образце, предусматривающий приведение образца в контакт с антителом по любому из пп.1-28 при условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом и GITR, и выявление образования комплекса.

51. Выделенное антитело, которое связывается с человеческим индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR), содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно, и модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2 и по меньшей мере один из CH1, CH2 и CH3, которые не относятся к изотипу IgG2, причем антитело к анти-GITR характеризуется повышенной агонистической активностью в сравнении с таким же антителом к анти-GITR, но с шарниром, не являющимся шарниром IgG2.

52. Антитело к GITR по п.51, в котором модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 223-226 и 283-290, или константный участок тяжелой цепи, который отличается от них не более чем 5 аминокислотами или является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 223-226 и 283-290.

28F3 QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAFGKGLEWVAIVYEGSNKYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQNSLRAEDTAVYYCARGGSMVVRGDIYYGMDVWGQGTITVVS  
 18E10 QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAFGKGLEWVAIVYEGSNKYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQNSLRAEDTAVYYCARGGRIAVAFYYEMDVMWGQGTITVVS  
 19D3 QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAFGKGLEWVAIVYEGSNKYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQNSLRAEDTAVYYCARGGQLDIYYVMDVMWGQGTITVVS  
 VL:  
 28F3 AIQLTQSPFSLASVGDVITITCRASQGISLAWYQKPKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSSTDFTLTISLQPEDFATYCCQFNSYFYTFGGQTKLEIK  
 18E10 DIQMTQSPFSLASVGDVITITCRASQGISLAWYQKPKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSSTDFTLTISLQPEDFATYCCQFNSYFYTFGGQTKLEIK  
 19D3 DIQMTQSPFSLASVGDVITITCRASQGISLAWYQKPKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSSTDFTLTISLQPEDFATYCCQFNSYFYTFGGQTKLEIK

Фиг. 1

VH антитела к G1TR 28F3 (hlgG2)

V сегмент: 3-33  
 D сегмент: 3-10  
 J сегмент: JH6b

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S  
 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52 L R L S C A A S G F T F S S Y G M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG

103 H W V R Q A P G K G L E N V A V I  
 CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

154 W Y E G S N K Y Y A D S V K G R F  
 TGG TAT GAA GGA AGT AAT AAA TAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L Y L Q M N S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256 L R A E D T A V Y Y C A R G G S M  
 CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG AGT ATG

307 V R G D Y Y Y G M D V W G Q G T T  
 GTT CGG GGG GAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358 V T V S S  
 GTC ACC GTC TCC TCA

Фиг. 2А

VK антитела к G1TR 28F3 (hКаппа)

V сегмент: L18  
 J сегмент: JK2

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D  
 GCC ATC CAG TTG ACC TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52 R V T I T C R A S Q G I S S A L A  
 AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

103 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A  
 TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

154 S S L E S G V P S R F S G S G S G  
 TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205 T D F T L T I S S L Q P E D F A T  
 ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256 Y Y C Q Q F N S Y P Y T F G Q G T  
 TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307 K L E I K  
 AAG CTG GAG ATC AAA

Фиг. 2В

VH антитела к G1TR 18E10 (hlgG2)

V сегмент: 3-33  
 D сегмент: 6-19  
 J сегмент: JH6b

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G H S  
 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52 L R L S C A A S G F T F S S Y G M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG

103 H W V R Q A P G K G L E N V A V I  
 CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

154 W Y A G S N K Y Y A D S V K G R F  
 TGG TAT GCT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L Y L Q M N S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256 L R A E D T A V Y Y C A R G G R I  
 CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG GGT ATA

307 A V A F Y Y S M D V W G Q G T T V  
 GCA GTG GCC TTC TAC TAC AGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC

358 T V S S  
 ACC GTC TCC TCA

Фиг. 3А

037006

VK антитела к GITR 18E10 (hКарра)

V сегмент: L15  
J сегмент: JK2

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
      GAG ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      CDR1
52     R V T I T C T R A S Q G I S S W L A
      AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

      CDR2
103    W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

      S S L Q S G V P S R F S G S G S G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

      T D F T L T I S S L Q P E D F A T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      CDR3
256    Y Y C Q Q Y N S Y P Y T F G Q G T
      TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307    K L E I K
      AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

Фиг. 3В

VH антитела к GITR 19D3 (hIgG2)

V сегмент: 3-33  
D сегмент: 3-16  
J сегмент: JH6b

```

1      Q V Q L V E S G G S V V Q P G R S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG CTC CAA CCT GGG AGG TCC

      CDR1
52     L R L S C A A S G F T F S S Y G F
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC TTC

      CDR2
103    H W V R Q A P G K G L E W V A V I
      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

      W Y A G S N K F Y A D S V K G R F
154    TGG TAT GCT GGA AGT AAT AAA TTC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

      T I S R D N S K N T L Y L Q M N S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

      CDR3
256    L R A E D T A V Y Y C A R G Q L
      CTA AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGA CAG TTG

307    D Y Y Y Y V V M D V W G Q G T T V
      GAC TAC TAC TAT TAC GTT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC

358    T V S S
      ACG GTC TCC TCA
  
```

Фиг. 4А

VK антитела к GITR 19D3 (hКарра)

V сегмент: L15  
J сегмент: JK2

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      CDR1
52     R V T I T C T R A S Q G I S S W L A
      AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

      CDR2
103    W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

      S S L Q S G V P S R F S G S G S G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

      T D F T L T I S S L Q P E D F A T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      CDR3
256    Y Y C Q Q Y N S Y P Y T F G Q G T
      TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307    K L E I K
      AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

Фиг. 4В

# 037006

VH антитела к G1TR 3C3 (hlgG1)

V сегмент: 4-34  
J сегмент: JH3b

```

1      CAG GTG CAA CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC
      L S L T C A V Y G G S F S CDR1 G Y Y W
52     CTG TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG
      T W I R Q P P G K G L E W I G K I CDR2
103    ACC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AAA ATC
      N H S G N T N Y N P S L K S R V T
154    AAT CAT AGT GGA AAC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC
      I S V D T S K N Q F S L K L S S V
205    ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG
      T A A D T A V Y Y C A R CDR3 L G A F D
256    ACC GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CTG GGG GCC TTT GAT
      A F D I W G Q G T M V T V S S
307    GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
  
```

Фиг. 5А

VK1 антитела к G1TR 3C3 (hКарра)

V сегмент: L15  
J сегмент: JK2

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC
      R V T I T C R A S Q G I S S W L A CDR1
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC
      W Y Q Q K P E K A P K S L I Y CDR2 A A
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA
      S S L Q S G V P S R F S G S G S G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG
      T D F T L T I S S L Q P E D F A T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT
      Y Y C CDR3 Q Q Y N S Y F Y T F G Q G T
256    TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC
      K L E I K
307    AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

Фиг. 5B

VK2 антитела к G1TR 3C3 (hКарра)

V сегмент: L20  
J сегмент: JK2

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
      R A T L S C R A S Q G V S S Y L A CDR1
52     AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC
      W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y CDR2 D A
103    TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA
      S N R A T G I P A R F S G S G P G
154    TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG CCT GGG
      T D F T L T I S S L E P E D F A V
205    ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT
      Y Y C CDR3 Q Q R S N W H T F G Q G T K
256    TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG
      L E I K
307    CTG GAG ATC AAA
  
```

Фиг. 5С

037006

VH антитела к GITR 2G6 (hIgG1)

V сегмент: 3-33  
J сегмент: JH6b

```

1      Q V Q L V E S G G G V V Q P G G S
   CAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC

52      L R L S C A A S G F I L S D Y G M
   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ATC TTG AGT GAC TAT GGC ATG

103     H W V R Q A P G K G L E W V T V I
   CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGA CTG GAG TGG GTG ACA GTT ATC

154     W Y D G S N K F Y V D S V K G R F
   TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TTC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205     T I S R D N S K N T L Y L Q M N S
   ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG TTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256     L R V E D T A V Y Y C A R G R L
   CTG AGA GTC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGA CGT CTA

307     A T G H F Y Y V M D V W G Q G T T
   GCA ACA GST CAC TTC TAC TAC GTT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358     V T V S S
   GTC ACC GTC TCC TCA

```

Фиг. 6А

VK антитела к GITR 2G6 (hКаппа)

V сегмент: L15  
J сегмент: JK2

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52      R V T I T C R A S Q G I S S W L A
   AGA GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

103     W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A
   TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154     S S L Q S G V P S R F S G S G S G
   TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205     T D F T L T I S S L Q P E D F A T
   AGA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256     Y Y C Q Q Y N S Y P Y T F G Q G T
   TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307     K L E I K
   AAG CTG GAG ATC AAA

```

Фиг. 6В

VH антитела к GITR 8A6 (hIgG2)

V сегмент: 3-33  
D сегмент: 3-10  
J сегмент: JH6b

```

1      Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S
   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52      L R L S C T A S G F T F S Y G M
   CTG AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG

103     Q W V R Q A P G K G L E W V A V I
   CAG TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

154     W Y E G S N K Y Y A D S V K G R F
   TGG TAT GAA GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205     T I S R E N S K N T L Y L Q M N S
   ACC ATC TCC AGA GAA AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256     L R A E D T A V Y Y C A R G L M
   CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGC GGT CTT ATG

307     V R G L F Y Y G M D V W G Q G T T
   GTT CCG GGT CTC TTC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358     V T V S S
   GTC ACC GTC TCC TCA

```

Фиг. 7А

## 037006

VK антитела к G1TR 8A6 (hКарра)  
 V сегмент: L18  
 J сегмент: JK2

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D
   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

           CDR1
52      R V T I T C F A S Q G I S S A L A
   AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

           CDR2
103     W Y Q Q K P G K A P K F L I Y D A
   TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG TTC CTG ATC TAT GAT GCC

154     S S L E S G V P S R F S G S G S G
   TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205     T D F T L T I S S L Q P E D F A T
   ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

           CDR3
256     Y Y C Q Q F N S Y P Y T F G Q G T
   TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307     K L E I K
   AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

Фиг. 7B

VH антитела к G1TR 9G7 (hlgG4)

V сегмент: 3-15  
 D сегмент: 3-10  
 J сегмент: JH6b

```

1      E V Q L V E S G G G L V K P G G S
   GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTA AAG CCT GGG GGG TCC

           CDR1
52      L R L S C A A S G F T F S T V W M
   CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT ACC CTC TGG ATG

           CDR2
103     S W V R Q A P G K G L E W V G R I
   AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC CST ATT

154     K S K T D G G T T D Y A A P V K G
   AAA AGC AAA ACT GAT GGT GGG ACA ACA GAC TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC

205     R F T I S R D D S K N T L Y L Q M
   AGA TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG

           CDR3
256     N S L H T E D T A V Y Y C T T G Q
   AAC AGC CTG CAC ACC GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA GGG CAG

307     L I P Y S Y Y Y G M D V W G Q G T
   CTG ATC CCT TAC TCC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC

358     S V T V S S
   TCG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Фиг. 8A

VK1 антитела к G1TR 9G7 (hКарра)

V сегмент: A27  
 J сегмент: JK1

```

E I V L T Q S P G T L S L S P G E
1      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

           CDR1
52      R A T L S C R A S Q S V S S S Y L
   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

           CDR2
103     A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G
   GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

154     A S S R A T G I P D R F S G S G S
   GCA TCC AGC AGS GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

205     G T D F T L T I S R L E P E D F A
   GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

           CDR3
256     V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G Q G
   GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG

307     T K V E I K
   ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

Фиг. 8B

037006

VK2 антитела к G1TR 9G7 (hKappa)  
V сегмент: A27  
J сегмент: JK5

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E  
GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA  
CDR1  
52 R A T L S C R A S Q S V T S S Y L  
AGA GGC ACC CTC TCC TGC AGG GGC AGT CAG AGT GPT ACC AGC AGC TAC TTA  
CDR2  
103 A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G  
GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT  
154 A S S R A T G I P E R F S G S G S  
GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAG AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT  
205 G T D F T L T I S R L E P E D F A  
GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA  
CDR3  
256 V Y Y C Q Q Y G S S P I T F G Q G  
GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG  
307 T R L E I K  
ACA CGA CTG GAG ATT AAA

Фиг. 8С

VH антитела к G1TR 14E3 (hIgG1)

V сегмент: 4-34  
J сегмент: JH3b

1 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T  
CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC  
CDR1  
52 L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W  
CTG TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG  
CDR2  
103 S W I R Q P P G K G L E W I G E I  
AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGA GAA ATC  
154 N H S G N T Y Y N P S L K S R V T  
AAT CAT AGT GGA AAC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGC GTC ACC  
205 I S V D T S K N Q L S L K L S S V  
ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTA TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG  
CDR3  
256 T A A D T A V Y Y C A R F G S N D  
ACC GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA TTT GGG AGT AAT GAT  
307 A F D I N G Q G T M V T V S S  
GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA

Фиг. 9А

VK антитела к G1TR 14E3 (hKappa)  
V сегмент: L15  
J сегмент: JK1

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D  
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC  
CDR1  
52 R V T I T C R A S Q G I S S W L A  
AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC  
CDR2  
103 W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A  
TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA  
154 S S L Q S G V P S R F S G S G S G  
TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG  
205 T D F T L T I S S L Q P E D F A T  
ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT  
CDR3  
256 Y Y C Q Q Y N S Y P P T F G Q G T  
TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC  
307 K V E I K  
AAG GTG GAA ATC AAA

Фиг. 9В

037006

VH антитела к GITR 19H8 (hlgG2)

V сегмент: 3-33  
D сегмент: 3-10  
J сегмент: JH6b

```

1      Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S
   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTG CAG CCT GGG AGG TCC

52      L R L S C A A S G F T F S N Y G M
   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG

103     H W V R Q A P G K G L E W M A V I
   CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCA GTT ATA

154     W Y G G S N K F Y A D S V K G R F
   TGG TAT GGT GGA AGT AAT AAA TTC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205     T I S R D N S K N S L S L Q M N S
   ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC TCG CTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC

256     L R A E D T A V Y Y C A R G G A M
   CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC GCT ATG

307     V R G V Y Y Y G M D V W G Q G T T
   GTT DGG GGA GTC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACC

358     V T V S S
   GTC ACC GTC TCC TCA

```

Фиг. 10А

VK1 антитела к GITR 19H8 (hКарра)

V сегмент: L18  
J сегмент: JK1

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D
   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52      R V T I T C R A S Q G I S S A L A
   AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

103     W Y Q Q K P G K A P K F L I Y D A
   TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG TTC CTG ATC TAT GAT GCC

154     S S L E S G V P S R F S G S G S G
   TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205     T D F T L T I S S L Q P E D F A T
   ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256     Y Y C Q Q F N S Y P Q T F G Q G T
   TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CAG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

307     K V E I K
   AAG GTG GAA ATC AAA

```

Фиг. 10В

VK2 антитела к GITR 19H8 (hКарра)

V сегмент: L6  
J сегмент: JK4

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E
   GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

52      R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

103     W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A
   TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

154     S N R A T G I P A R F S G S G S G
   TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

205     T D F T L T I S S L E P E D F A V
   ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

256     Y Y C Q Q R S N W P L T F G G G T
   TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

307     K V E I K
   AAG GTG GAG ATC AAA

```

Фиг. 10С

037006

VH антитела к G1TR 6G10 (hlgG2)

V сегмент: 3-33  
D сегмент: 3-10  
J сегмент: JH6b

```

1      Q V Q L V E S G G D V V Q P G R S
   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                     CDR1
52      L R L S C A A S G F T F S T Y G M
   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT GGC ATG

                                     CDR2
103     H W V R Q A P G K G L E W V A V T
   CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ACA

                                     CDR3
154     W Y A G S N K F Y A D S V K G R F
   TGG TAT GCT GGA AGT AAT AAA TTT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205     T I S R D N S K N T L Y L Q M N S
   ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256     L R A E D T A V Y Y C A R G G S M
   CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGA GGT AGT ATG

307     V R G L Y Y Y G M D V W G Q G T T
   GTT CGG GGA CTT TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358     V T V S S
   GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Фиг. 11А

VK1 антитела к G1TR 6G10 (hКарра)

V сегмент: L18  
J сегмент: JK2

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D
   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                     CDR1
52      R V T I T C R A S Q G I S S A L A
   AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

                                     CDR2
103     W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A
   TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

154     S S L E S G V P S R F S G S G S G
   TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205     T D F T L T I S S L Q P E D F A T
   ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256     Y Y C Q Q F N S Y E Y T F G Q G T
   TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307     K L E I K
   AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

Фиг. 11В

VH антитела к G1TR 28F3 (hlgG2)

```

3-33  Q V Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C A
28F3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                     CDR1
3-33  A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
28F3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                     CDR2
3-33  W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T
28F3 VH - - - - - E - - - - - - - - - - - - -

3-33  I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
28F3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

3-33  V Y Y C A R M V R G Y Y Y G M D V W G
3-10   - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
JH6    - - - - - G G S - - - - - D - - - - -
28F3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

JH6    Q G T T V T V S S
28F3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
  
```

Фиг. 12

VK антитела к G1TR 28F3 (hКарра)

```

L18   A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
28F3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                     CDR1
L18   R A S Q G I S S A L A W Y Q Q K P G K A P K L
28F3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                     CDR2
L18   L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T
28F3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                     CDR3
L18   D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N
28F3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

L18   N Y
JK2    - - - - - Y T F G Q G T K L E I K
28F3 VK S - P - - - - - - - - - - - - - - -
  
```

Фиг. 13

037006

VH антитела к GITR 18E10 (hlgG2)

```

3-33   Q V Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C A
18E10 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR1
3-33   A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
18E10 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR2
3-33   W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T
18E10 VH - - - - - A - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
3-33   I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
18E10 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
3-33   V Y Y C A R I A V A
6-19   JH6 I A V A Y Y G M D V W G Q
18E10 VH - - - - - G G R - - - - - F - - S - - - - -
          CDR3
JH6   G T T V T V S S
18E10 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
    
```

Фиг. 14

VK антитела к GITR 18E10 (hКарра)

```

L15   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
18E10 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR1
L15   R A S Q G I S S W L A W Y Q K P E K A P K S
18E10 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR2
L15   L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T
18E10 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
L15   D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N
18E10 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
L15   S Y
JK2   Y T F G Q G T K L E I K
18E10 VK - - P - - - - - - - - - - - - - - - - - -
    
```

Фиг. 15

VH антитела к GITR 19D3 (hlgG2)

```

3-33   Q V Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C A
19D3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR1
3-33   A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
19D3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR2
3-33   W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T
19D3 VH - - - - - A - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
3-33   I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
19D3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
3-33   V Y Y C A R D Y
3-16   JH6 Y Y Y Y G M D V W G Q
19D3 VH - - - - - G G Q L - - - - - V - - - - -
          CDR3
JH6   G T T V T V S S
19D3 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
    
```

Фиг. 16

VK антитела к GITR 19D3 (hКарра)

```

L15   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
19D3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR1
L15   R A S Q G I S S W L A W Y Q K P E K A P K S
19D3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR2
L15   L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T
19D3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
L15   D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N
19D3 VK - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
          CDR3
L15   S Y
JK2   Y T F G Q G T K L E I K
19D3 VK - - P - - - - - - - - - - - - - - - - - -
    
```

Фиг. 17



037006

VH антитела к GITR 8A6 (hIgG2)

```

3-33 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A
INPUT - - - - -

3-33 A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
INPUT - - - - - CDR1
- - - - - Q - - - - -

3-33 W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T
INPUT - - - - - CDR2
- - - - - E - - - - -

3-33 I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
INPUT - - - - -

3-33 V Y Y C A R CDR3
3-10 M V R G
JH6 Y Y G M D V W G
INPUT - - - - - G G L - - - - L F - - - - -

JH6 Q G T T V T V S S
INPUT - - - - -

```

Фиг. 22

VK антитела к GITR 8A6 (hКарра)

```

L18 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
INPUT - - - - -

L18 R A S Q G I S S A L A W Y Q Q K P G K A P K L
INPUT - - - - - CDR1
- - - - - F - - - - -

L18 L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T
INPUT - - - - - CDR2
- - - - - - - - - - -

L18 D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N
INPUT - - - - - CDR3
- - - - - - - - - - -

L18 N Y
JK2 Y T F G Q G T K L E I K
INPUT S - P - - - - -

```

Фиг. 23

VH антитела к GITR 9G7 (hIgG4)

```

3-15 E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A
INPUT - - - - -

3-15 A S G F T F S N A W M S W V R Q A P G K G L E
INPUT - - - - - CDR1
- - - - - T V - - - - -

3-15 W V G R I K S K T D G G T T D Y A A P V K G R
INPUT - - - - - CDR2
- - - - - - - - - - -

3-15 F T I S R D D S K N T L Y L Q M N S L K T E D
INPUT - - - - -
- - - - - H - - - - -

3-15 T A V Y Y C T T CDR3
3-10 Y Y Y G
JH6 Y Y Y Y G M D V W
INPUT - - - - - G Q L I P - S - - - - -

JH6 G Q G T T V T V S S
INPUT - - - - - S - - - - -

```

Фиг. 24

VK1 антитела к GITR 9G7 (hКарра)

```

A27 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C
INPUT - - - - -

A27 R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R
INPUT - - - - - CDR1
- - - - - T - - - - -

A27 L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G
INPUT - - - - - CDR2
- - - - - - - - - - -

A27 T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y
INPUT - - - - - CDR3
- - - - - - - - - - -

A27 G S S
JK1 W T F G Q G T K V E I K
INPUT - - - - - P - - - - -

```

Фиг. 25А

VK2 антитела к GITR 9G7 (hКарра)

```

A27 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C
INPUT - - - - -

A27 R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R
INPUT - - - - - CDR1
- - - - - T - - - - -

A27 L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G
INPUT - - - - - CDR2
- - - - - - - - - - -

A27 T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y
INPUT - - - - - CDR3
- - - - - - - - - - -

A27 G S S
JK5 I T F G Q G T R L E I K
INPUT - - - - - P - - - - -

```

Фиг. 25В

ВН антитела к GITR 14E3 (hlgG1)

```

4-34 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A
INPUT - - - - -

4-34 V Y G G S F S G Y Y W S W I R Q P P G K G L E
INPUT - - - - - CDR1

4-34 W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I
INPUT - - - - - CDR2

4-34 S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V
INPUT - - - - -

4-34 Y Y C A R
JH3 D A F D I W G Q G T M V T V
INPUT - - - - - CDR3

JH3 S S
INPUT - -
    
```

Фиг. 26

VK антитела к GITR 14E3 (hKappa)

```

L15 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
INPUT - - - - -

L15 R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P E K A P K S
INPUT - - - - - CDR1

L15 L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T
INPUT - - - - - CDR2

L15 D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N
INPUT - - - - - CDR3

L15 S Y
JK1 T F G Q G T K V E I K
INPUT - - P P - - - -
    
```

Фиг. 27

ВН антитела к GITR 19H8 (hlgG2)

```

3-33 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A
INPUT - - - - -

3-33 A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
INPUT - - - - - CDR1

3-33 W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T
INPUT - - - - - CDR2

3-33 I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
INPUT - - - - -

3-33 V Y Y C A R
3-10 Y Y Y
JH6 Y Y Y G M D V W G
INPUT - - - - - CDR3

JH6 Q G T T V T V S S
INPUT - - - - -
    
```

Фиг. 28

VK1 антитела к GITR 19H8 (hKappa)

```

L18 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
INPUT - - - - -

L18 R A S Q G I S S A L A W Y Q Q K P G K A P K L
INPUT - - - - - CDR1

L18 L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T
INPUT - - - - - CDR2

L18 D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N
INPUT - - - - - CDR3

L18 N Y
JK1 T F G Q G T K V E I K
ВВОД S - P Q - - - -
    
```

Фиг. 29А

VK2 антитела к GITR 19H8 (hKappa)

```

L6 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C
INPUT - - - - -

L6 R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L
INPUT - - - - - CDR1

L6 L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T
INPUT - - - - - CDR2

L6 D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S
INPUT - - - - - CDR3

L6 N W
JK4 L T F G G G T K V E I K
INPUT - - P - - -
    
```

Фиг. 29В

VH антитела к G1TR 6G10 (hlgG2)

```

3-33   Q V Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C A
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

3-33   A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

3-33   W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T
INPUT  - - - - - T - - - - - A - - - - - F - - - - -

3-33   I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

3-33   V Y Y C A R - CDR3 -
3-10   M V R G
JH6    Y Y Y G M D V W G
INPUT  - - - - - G G S - - - - - L - - - - -

JH6    Q G T T V T V S S
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
    
```

Фиг. 30

VK1 антитела к G1TR 6G10 (hKappa)

```

L18   A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

L18   R A S Q G I S S A L A W Y Q Q K P G K A P K L
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

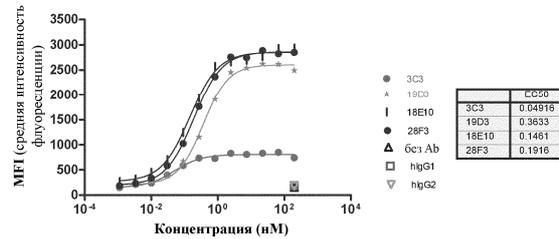
L18   L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

L18   D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N
INPUT  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

L18   N Y
JK2   Y T F Q G T K L E I K
INPUT  S - P - - - - - - - - - - - - - - - -
    
```

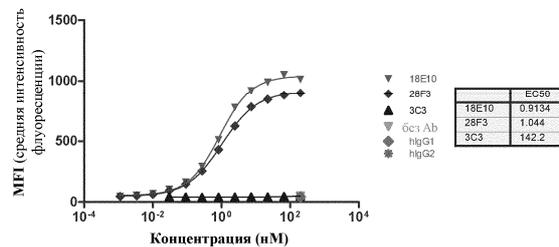
Фиг. 31

Связывание mAb к G1TRc активированными  
человеческими Т-клетками



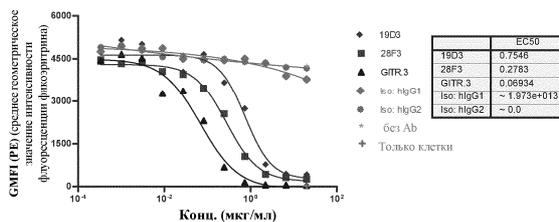
Фиг. 32

Связывание mAb к G1TR с активированными  
Т-клетками яванского макака



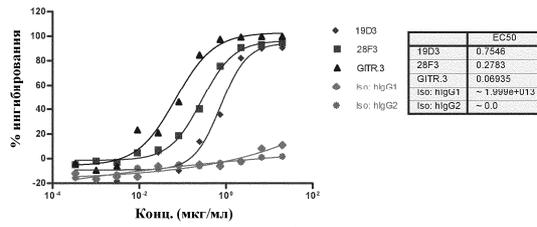
Фиг. 33

НuMAb к G1TR блокируют связывание G1TR с G1TR-  
3A9 клетками

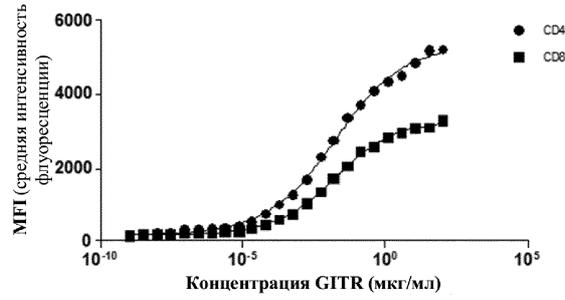


Фиг. 34А

НuMAb к GITR ингибируют связывание GITR с GITR-3A9 клетками

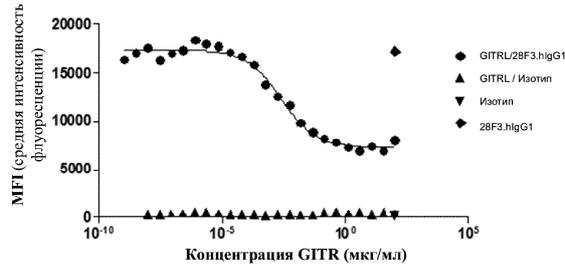


Фиг. 34В



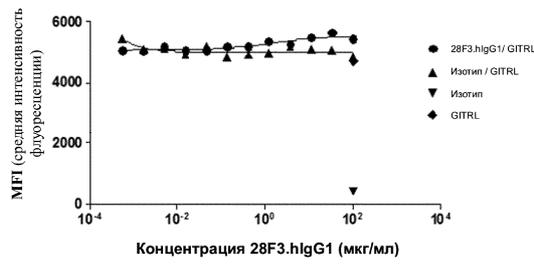
	CD4	CD8
IC50	0.01605	0.01635

Фиг. 34С

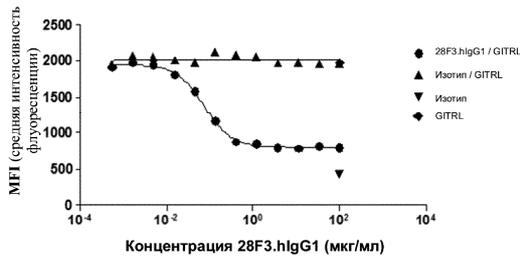


	GITRL/28F3.hlgG1
IC50	0.002440

Фиг. 34D



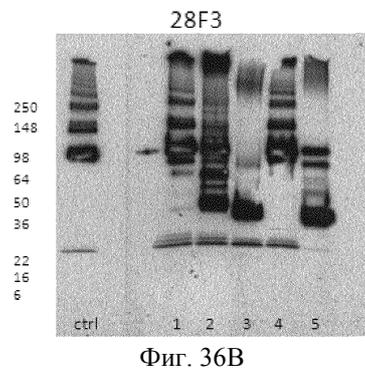
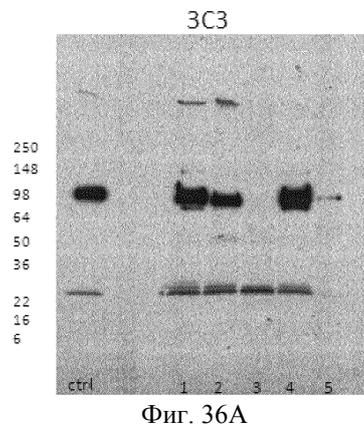
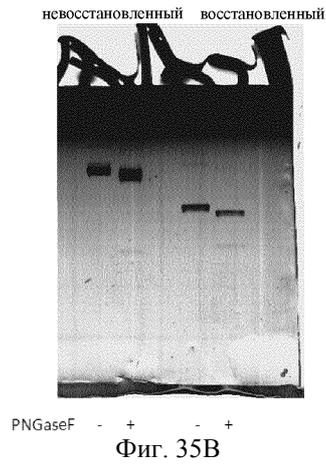
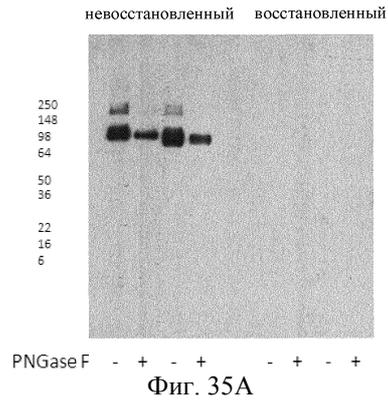
Фиг. 34Е



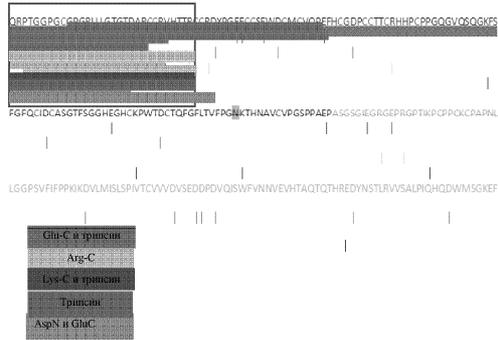
	28F3.hlgG1 / GITRL
IC50	0,07575

Фиг. 34F

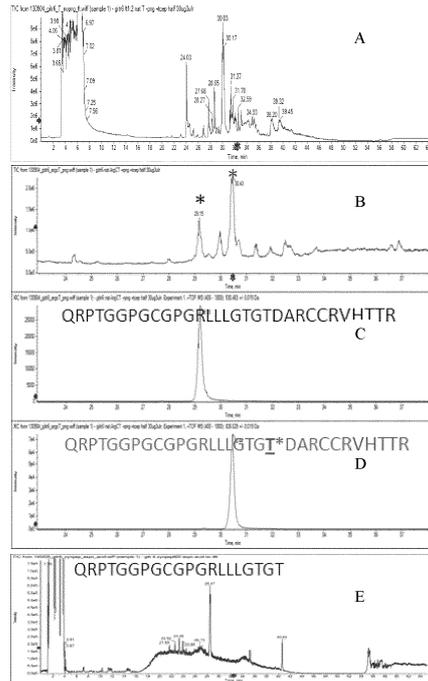
037006



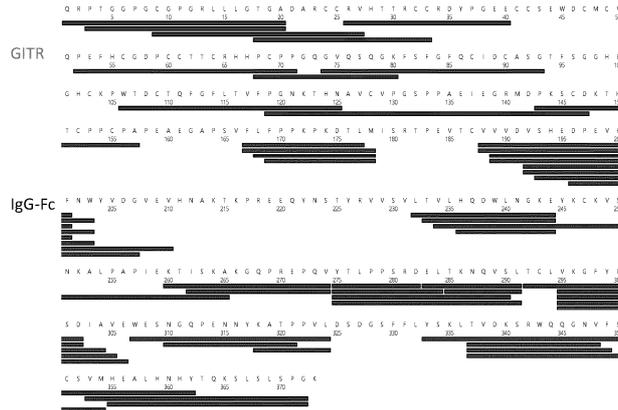
037006



Фиг. 37



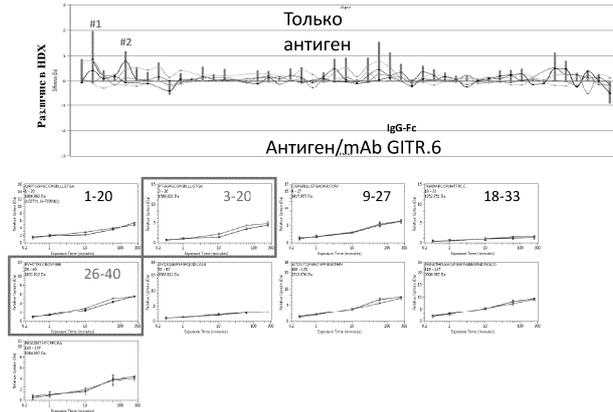
Фиг. 38А-38Е



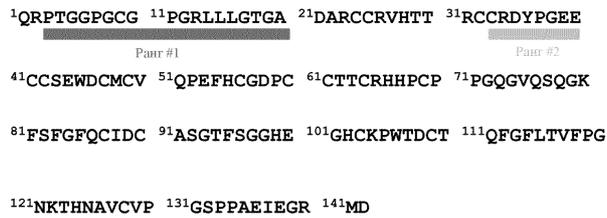
Всего: охват 81.0%, избыточность 2,38

охват последовательности 86%

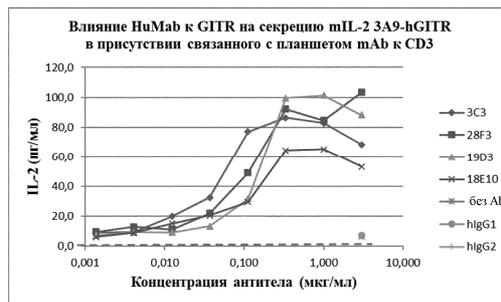
Фиг. 39А



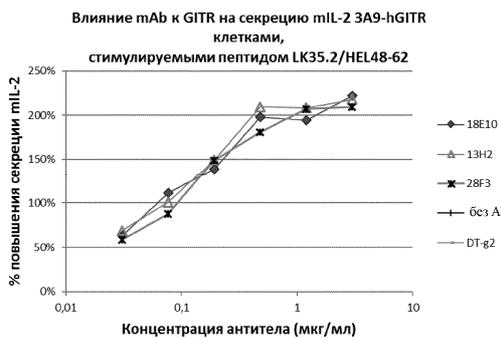
Фиг. 39В



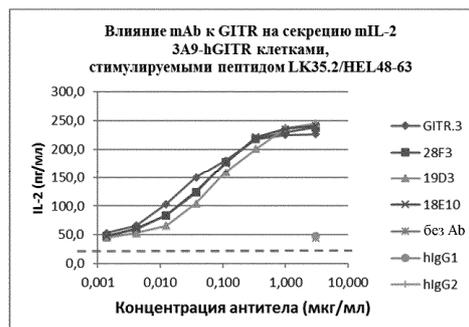
Фиг. 39С



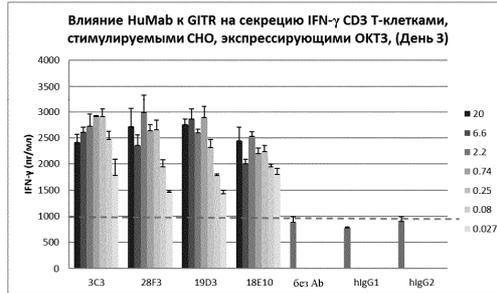
Фиг. 40



Фиг. 41А

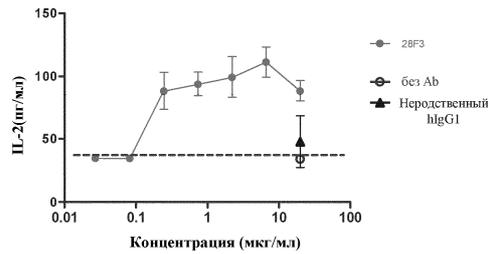


Фиг. 41В



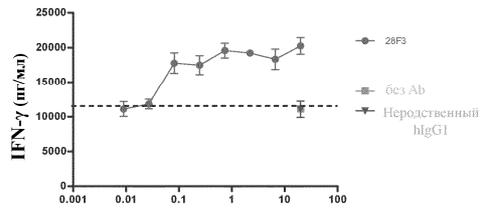
Фиг. 42А

**Влияние mAb к GITR на секрецию IL-2 CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, (День 2) – Донор №1**



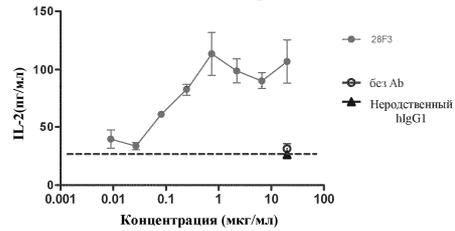
Фиг. 42В

**Влияние mAb к GITR на секрецию IFN- $\gamma$  CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, (День 3) – Донор №1**



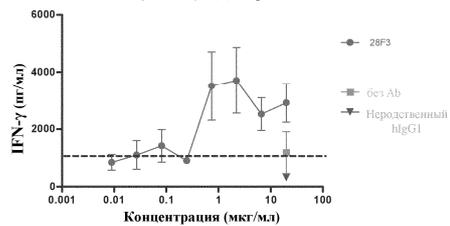
Фиг. 42С

**Влияние mAb к GITR на секрецию IL-2 CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, (День 2) – Донор №2**

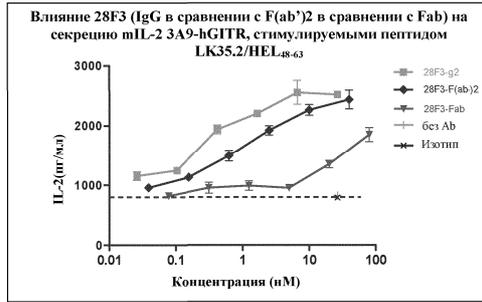


Фиг. 42D

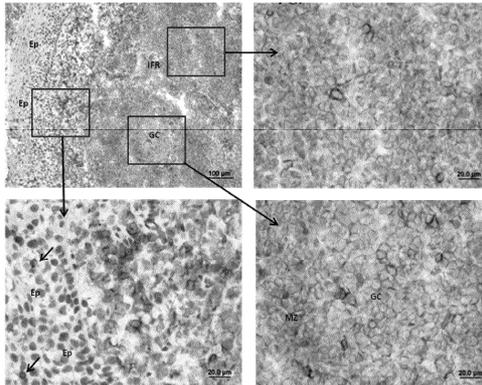
**Влияние mAb к GITR на секрецию IFN- $\gamma$  CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3, (День 3) – Донор №2**



Фиг. 42Е

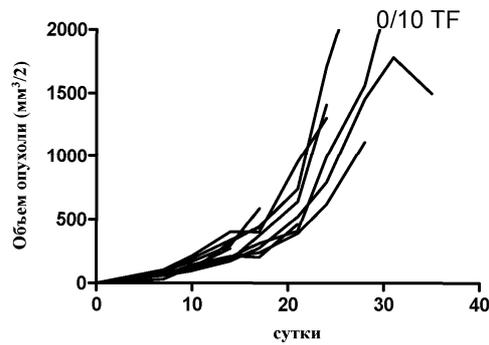


Фиг. 43



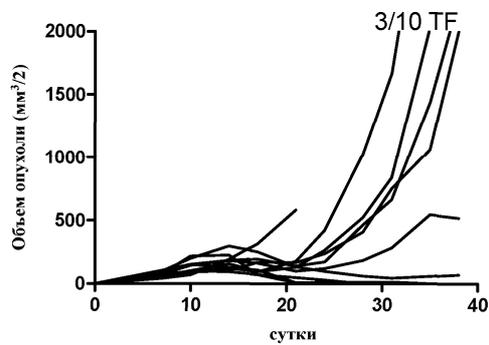
Фиг. 44

mIgG1 – 10 мг/кг



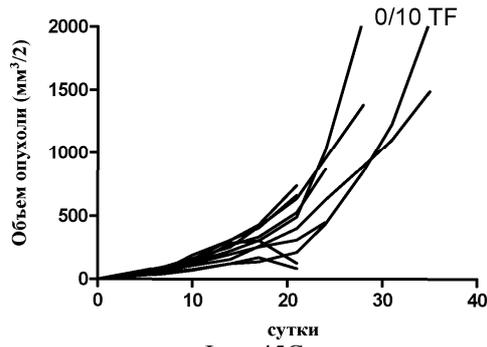
Фиг. 45А

DTA-1-rG2b – 10 мг/кг



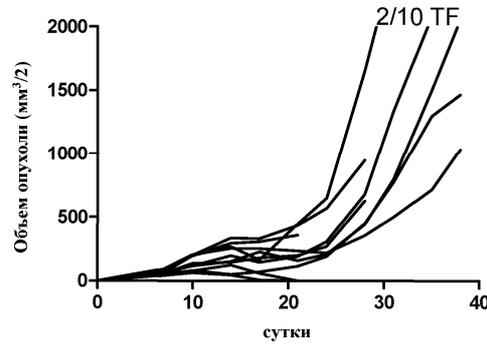
Фиг. 45В

DTA-1-mG1 – 10 мг/кг



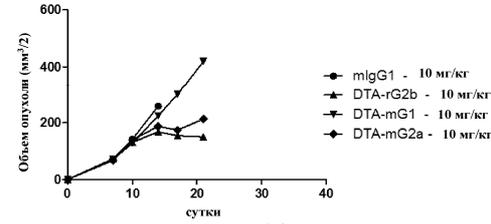
Фиг. 45С

DTA-1-mG2a – 10 мг/кг



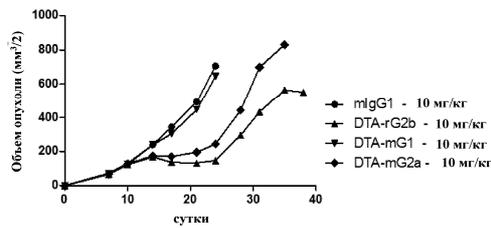
Фиг. 45D

А. Средние значения 10 мг/кг



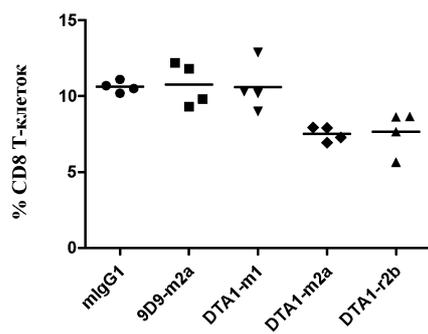
Фиг. 46А

Медианные значения 10 мг/кг



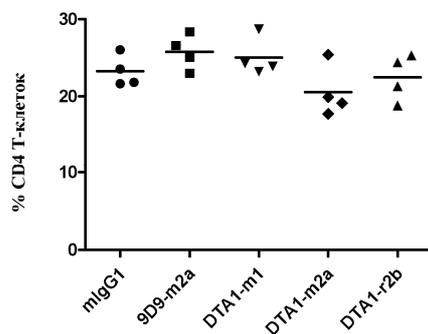
Фиг. 46В

% CD8+ Т-клеток



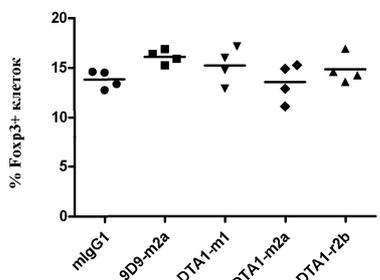
Группы  
Фиг. 47А

% CD4 Т-клеток



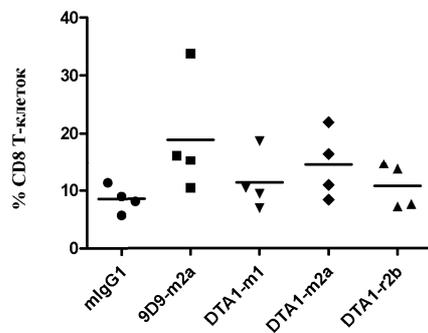
Группы  
Фиг. 47В

% Foxp3+ клеток в гейте CD4 Т-клеток



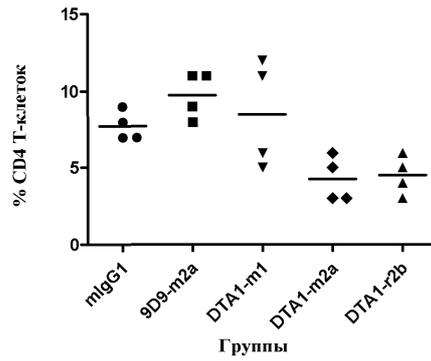
Группы  
Фиг. 47С

% CD8+ Т-клеток



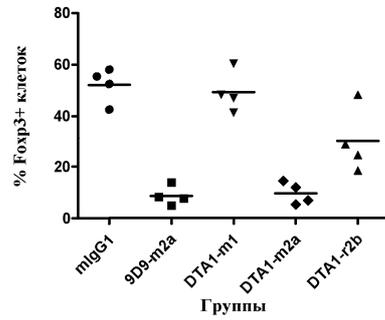
Группы  
Фиг. 47D

% CD4 T-клеток



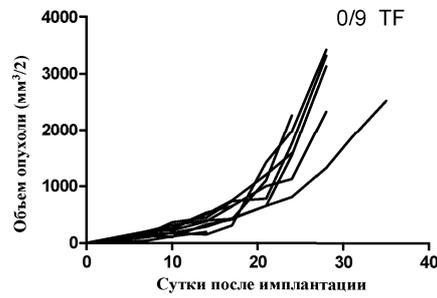
Фиг. 47Е

% Foxp3+ клеток в гейте CD4 T-клеток



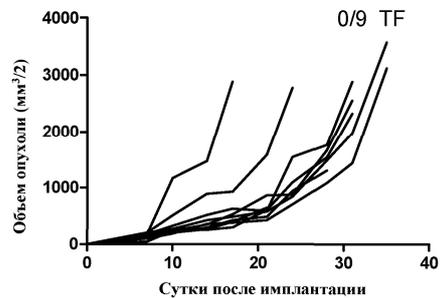
Фиг. 47F

1. mlgG1



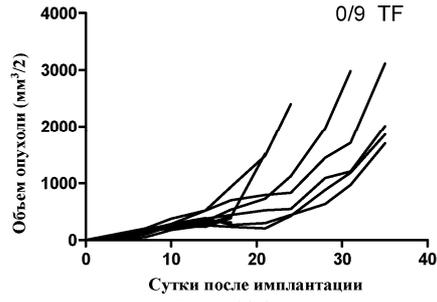
Фиг. 48А

2. mGITR.7 mg1



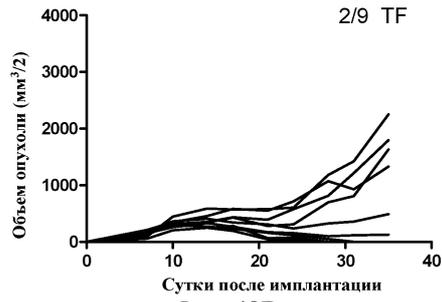
Фиг. 48В

3. mGfTR.7 mg1 D265A



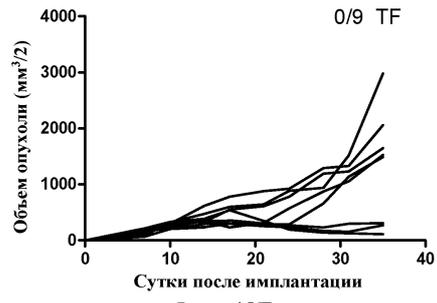
Фиг. 48С

4. mGfTR.7 mg2a



Фиг. 48D

5. mGfTR.7 mg2b



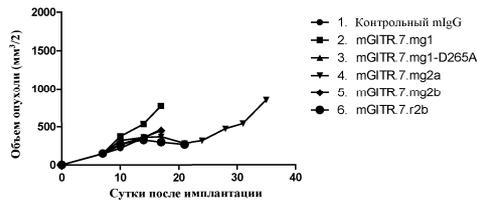
Фиг. 48E

6. mGfTR.7 rg2b

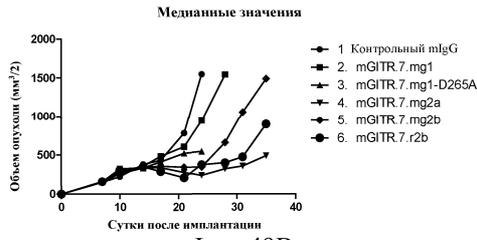


Фиг. 48F

Средние значения

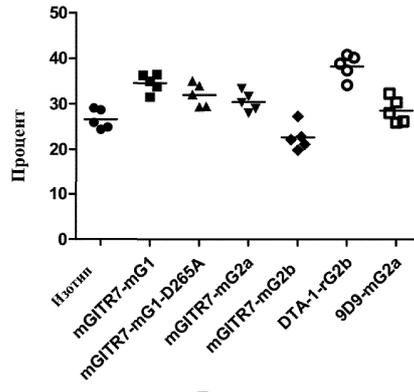


Фиг. 49А



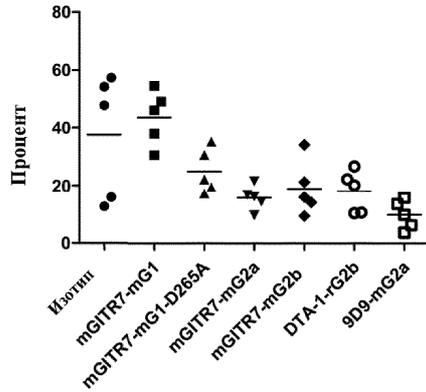
Фиг. 49В

% Foxp3+/CD4+ в селезенке

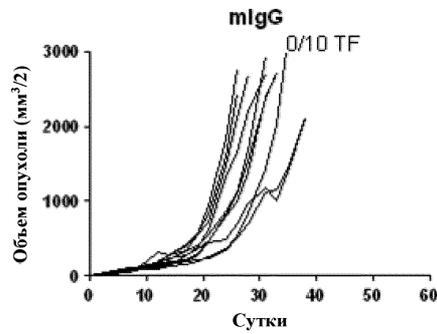


Фиг. 50А

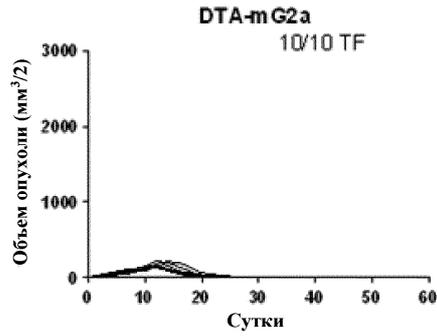
% Foxp3+/CD4+ среди TIL



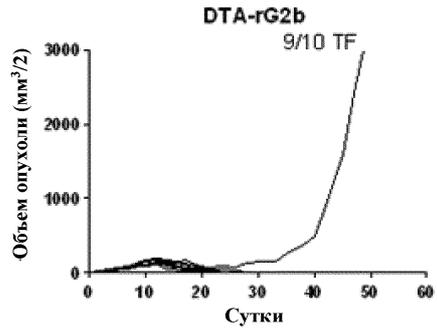
Фиг. 50В



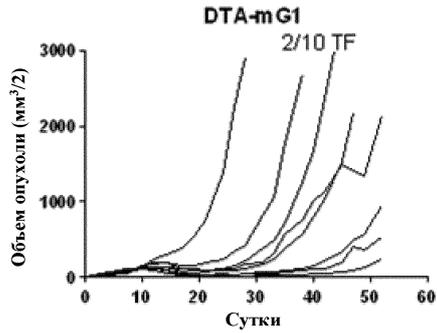
Фиг. 51А



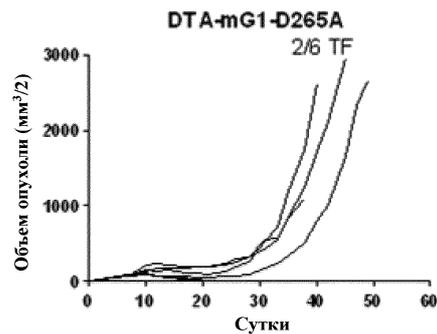
Фиг. 51В



Фиг. 51С



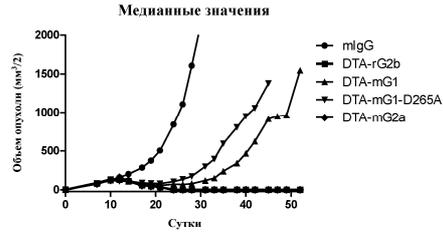
Фиг. 51D



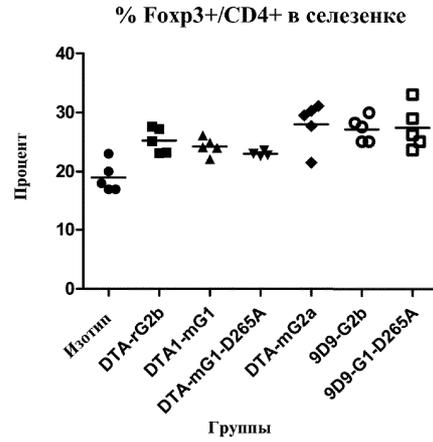
Фиг. 51E



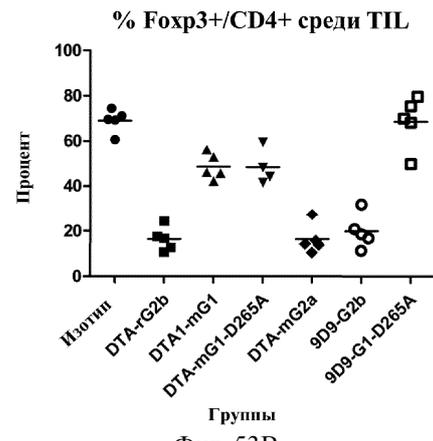
Фиг. 52А



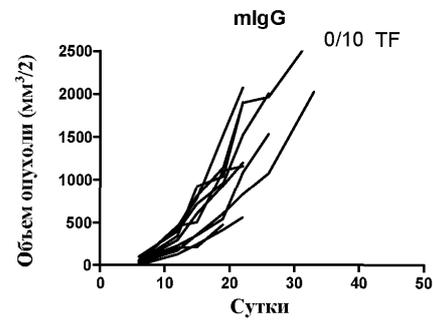
Фиг. 52В



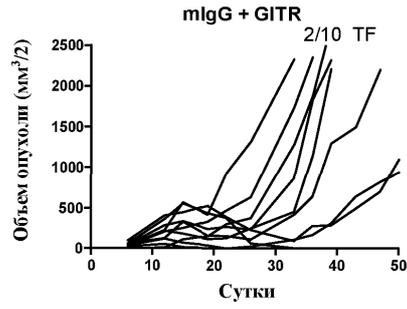
Фиг. 53А



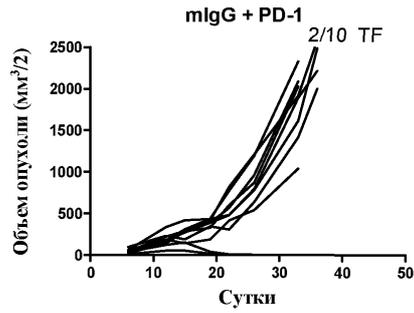
Фиг. 53В



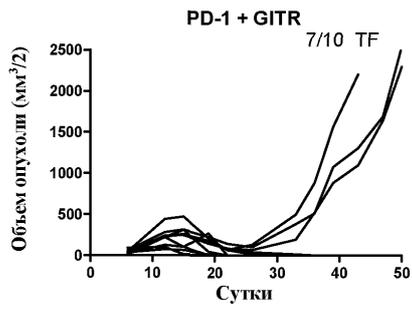
Фиг. 54А



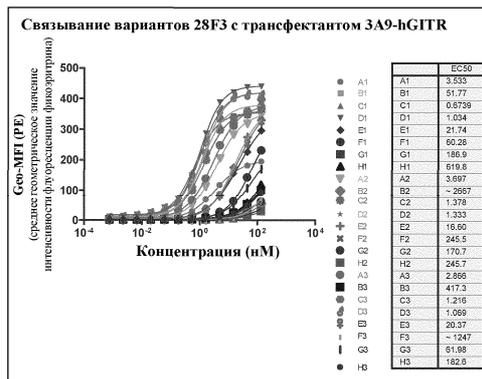
Фиг. 54В



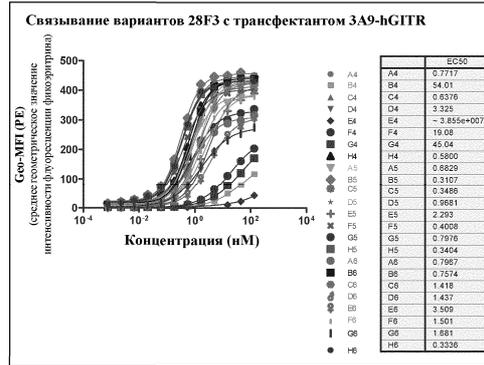
Фиг. 54С



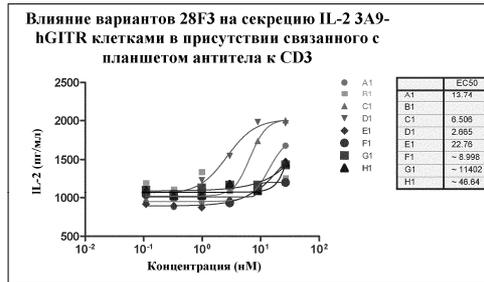
Фиг. 54D



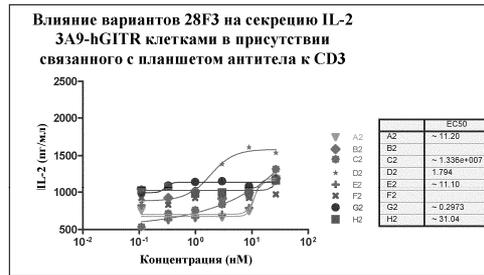
Фиг. 55А



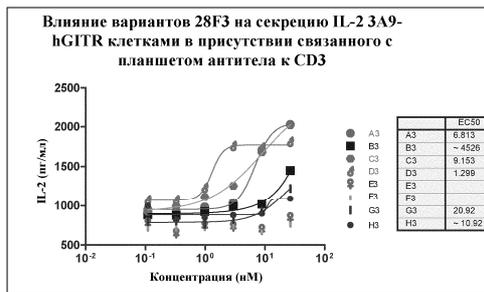
Фиг. 55В



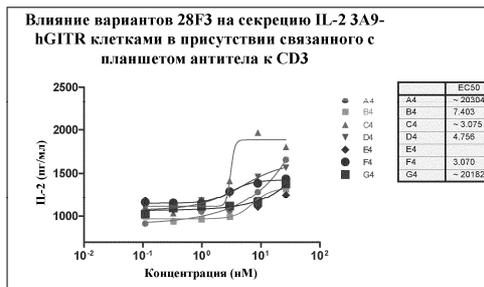
Фиг. 56А



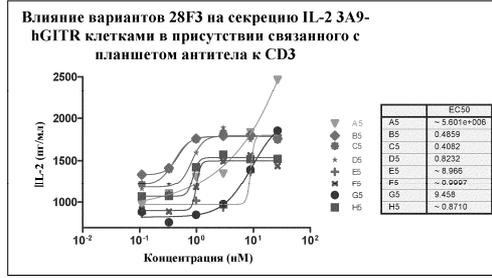
Фиг. 56В



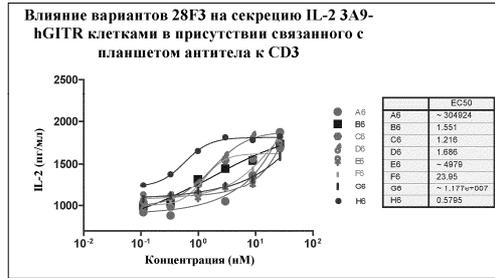
Фиг. 56С



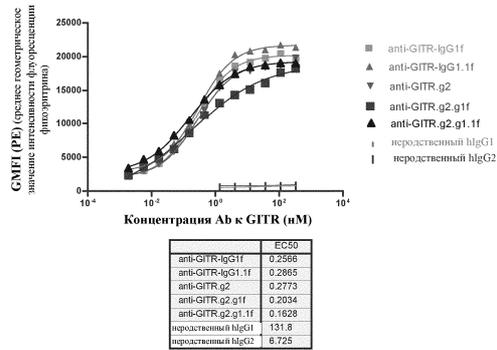
Фиг. 56D



Фиг. 56Е

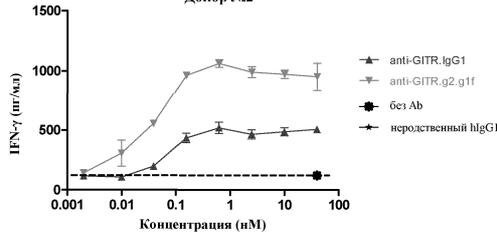


Фиг. 56F



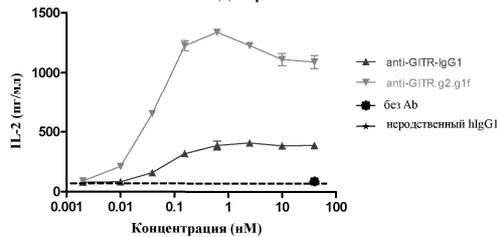
Фиг. 57

**Влияние Аб к G1TR на секрецию IFN-γ CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3 – Донор №2**



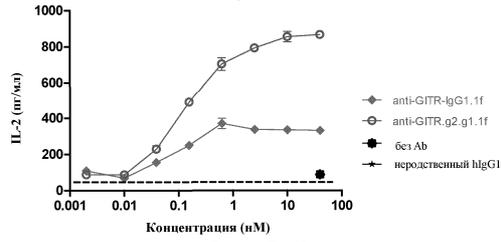
Фиг. 58А

**Влияние Аб к G1TR на секрецию IL-2 CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3 – Донор №3**

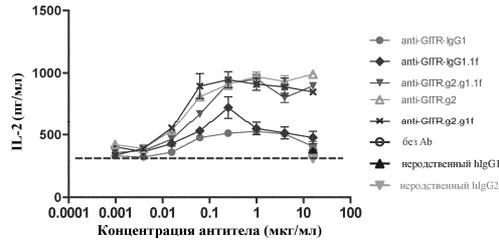


Фиг. 58В

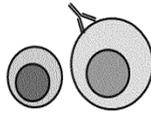
Влияние Аб к G1TR на секрецию IL-2 CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3 – Донор №3



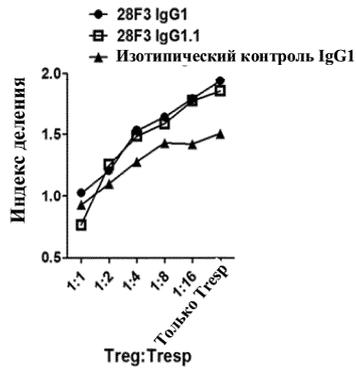
Фиг. 58С



Фиг. 59

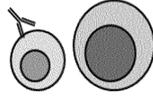


Treg	Teff
WT	huG1TR

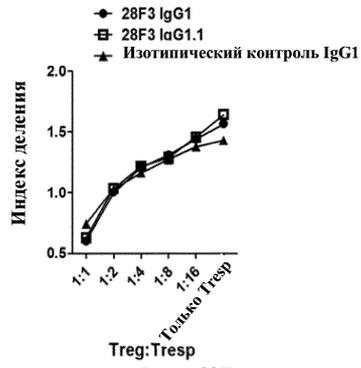


50 мкг/мл mAb

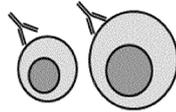
Фиг. 60А



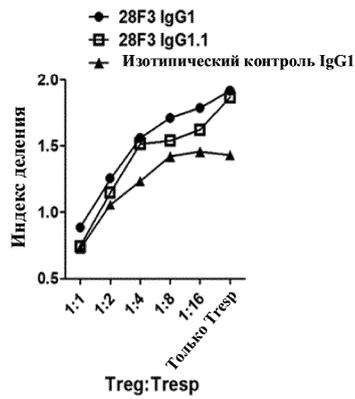
Treg	Teff
huGITR	WT



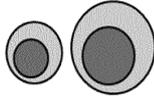
Фиг. 60B



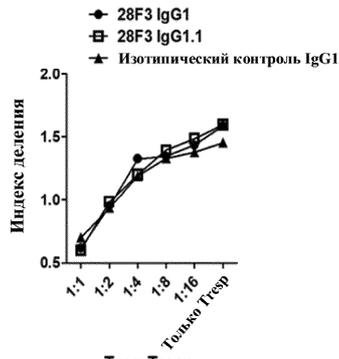
Treg	Teff
huGITR	huGITR



Фиг. 60C

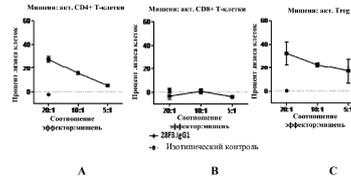


Treg	Teff
WT	WT

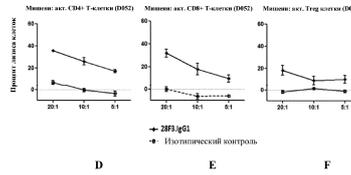


Трег:Тresp  
Фиг. 60D

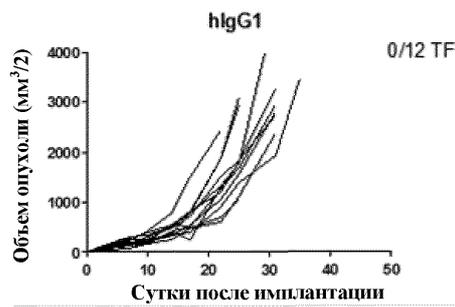
Донор 1



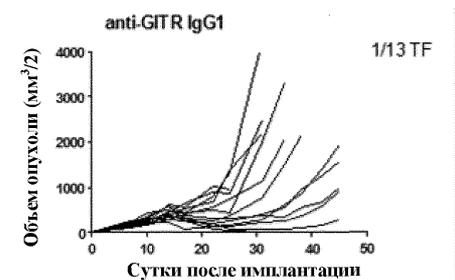
Донор 2



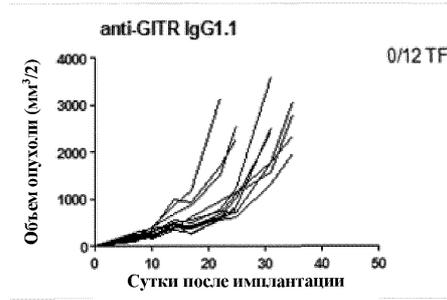
Фиг. 61A-F



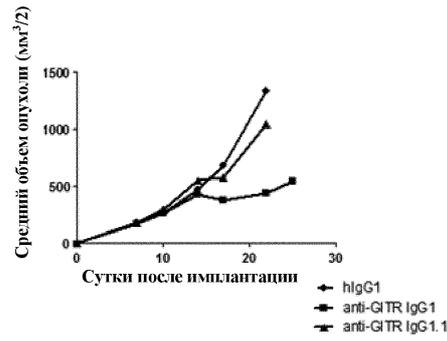
Фиг. 62A



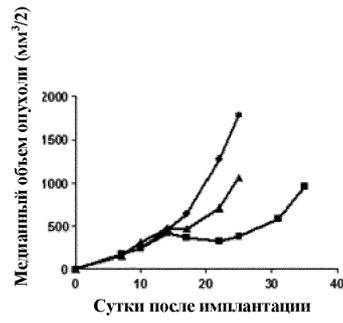
Фиг. 62B



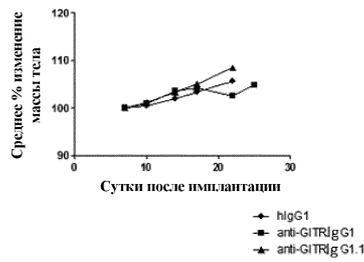
Фиг. 62С



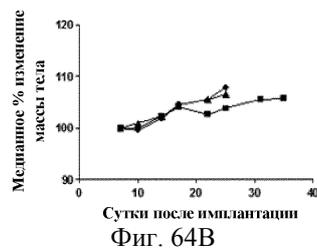
Фиг. 63А



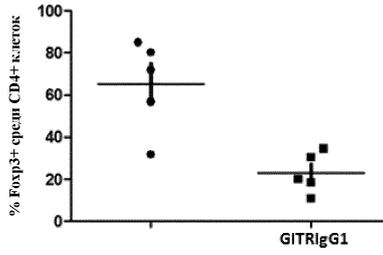
Фиг. 63В



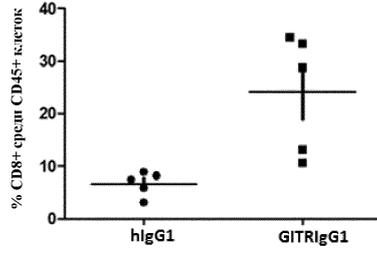
Фиг. 64А



Фиг. 64В

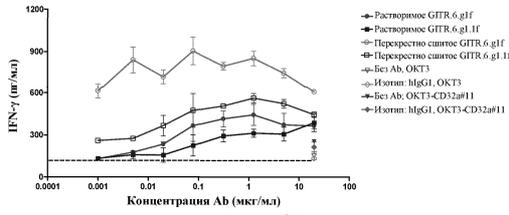


Фиг. 65



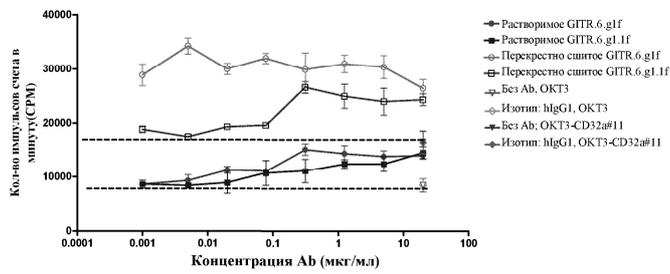
Фиг. 66

Влияние вариантов GITR.6 на секрецию IFN-γ Т-клетками в совместной культуре с СНО-ОКТ3 в сравнении СНО-ОКТ3-CD32a (#11)



Фиг. 67

Влияние вариантов GITR.6 на пролиферацию Т-клеток в совместной культуре с СНО-ОКТ3 в сравнении СНО-ОКТ3-CD32a (#11)



Фиг. 68

