

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037973**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.18

(21) Номер заявки
201891998

(22) Дата подачи заявки
2017.03.08

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К GITR, СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/305,270; 62/407,106**

(32) **2016.03.08; 2016.10.12**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/US2017/021258**

(87) **WO 2017/156058 2017.09.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Холланд Кам, Кихо Джон, Снайдер
Линда, Сепульведа Алехандро,
Вильярреаль Даниэль (US)**

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

(56) US-A1-20120189639
US-A1-20140286936
US-A1-20060257397
US-A1-20100021477
UniProtKB/TrEMBL Accession No. U2SSB6,
9 December 2009 [online]. [Retrieved on 10 July
2017]. Retrieved from the internet: <URL:http://
www.uniprot.org/uniprot/U2SSB6.txt?version=6>
Entire document

UniProtKB/TrEMBL Accession No.
A0A067JGQ0, 11 November 2015 [online].
[Retrieved on 10 July 2017]. Retrieved from the
internet: <URL:http://
www.uniprot.org/uniprot/A0A067JGQ0.txt?
version=4> Entire document

UniProtKB/TrEMBL Accession No.
A0A067KH38, 11 November 2015
[online]. [Retrieved on 10 July 2017].
Retrieved from the internet: <URL:http://
www.uniprot.org/uniprot/A0A067KH38.txt?
version=5> Entire document

WO-2015095186
US-A1-20110038867
US-A1-20150337037
US-A1-20060121580
US-A1-20150190506

(57) В описании изобретения предлагаются антитела, специфически связывающиеся с GITR. Также описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны способы применения предложенных антител. Например, предложенные антитела можно использовать для усиления иммунного ответа у пациента для лечения злокачественного новообразования.

B1**037973****037973****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США номер 62/305270, поданной 8 марта 2016 года, и временной заявки на патент США номер 62/407106, поданной 12 октября 2016 года. Полное содержание упомянутых выше заявок полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Перечень последовательностей

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 21 февраля 2017 г., называется JBI5082USNP_SL.txt и имеет размер 92231 байт.

Область техники, к которой относится изобретение

Представленное в настоящем документе описание относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с глюкокортикоид-индуцированным рецептором фактора некроза опухолей (GITR), и к способам получения и применения описанных антител.

Уровень техники

Глюкокортикоид-индуцированный TNFR-связанный белок (GITR; также называемый AITR, TNFRSF18 или CD357), который входит в суперсемейство TNFR, экспрессируется во многих компонентах врожденной и приобретенной иммунной системы и стимулирует формирование приобретенного и врожденного иммунитета (Nocentini G et al., (1994) PNAS 94: 6216-6221; Hanabuchi S et al., (2006) Blood 107:3617-3623; Nocentini G & Riccardi C (2005) Eur J Immunol 35: 1016-1022; Nocentini G et al., (2007) Eur J Immunol 37: 1165-1169). Этот белок экспрессируется в нескольких клетках и тканях, в том числе Т-, В-, дендритных (DC) природных киллерных (NK) клетках, и активируется своим лигандом, GITR-L, который в большинстве случаев экспрессируется на антиген-презентирующих клетках (APC), на эндотелиальных клетках, а также на клетках опухоли.

Система GITR-GITRL участвует в формировании аутоиммунного/воспалительного ответа и усиливает ответ на инфекцию и опухоли. Например, введение животным слитого белка GITR-Fc облегчает течение аутоиммунных/воспалительных заболеваний, а сигнал GITR эффективен при лечении вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, а также стимулирует иммунный ответ против опухолей (Nocentini G et al., (2012) Br J Pharmacol 165: 2089-99). Перечисленные эффекты связаны с несколькими одновременно протекающими механизмами, включая совместную активацию эффекторных Т-клеток, ингибирование регуляторных Т-клеток, модуляцию функции NK и дендритных клеток, активацию макрофагов и регулирование процесса экстравазации. Мембранная экспрессия GITR увеличивается после активации Т-клеток (Hanabuchi S et al, (2006) supra; Nocentini G & Riccardi C supra). Ее запуск приводит к совместной активации эффекторных Т-лимфоцитов (McHugh RS et al, (2002) Immunity 16: 311-323; Shimizu J et al, (2002) Nat Immunol 3: 135-142; Ronchetti S et al, (2004) Eur J Immunol 34: 613-622; Tone M et al, (2003) PNAS 100: 15059-15064). Активация GITR увеличивает резистентность по отношению к опухолям и вирусным инфекциям, она задействована в аутоиммунных/воспалительных процессах и регулирует экстравазацию лейкоцитов (Nocentini G & Riccardi C (2005) supra; Cuzzocrea S et al, (2004) J Leukoc Biol 76: 933-940; Shevach EM & Stephens GL (2006) Nat Rev Immunol 6: 613-618; Cuzzocrea S et al, (2006) J Immunol 177: 631-641; Cuzzocrea S et al, (2007) FASEB J 21: 117-129).

Уровень экспрессии GITR человека в периферических (неактивированных) Т-клетках весьма низок. После активации Т-клеток уровень GITR в течении нескольких дней резко повышается в клетках CD4⁺ и CD8⁺ (Kwon B et al., (1999) J Biol Chem 274: 6056-6061; Gurney AL et al., (1999) Curr Biol 9: 215-218; Ronchetti S et al, (2004) supra; Shimizu J et al, (2002) supra; Ji HB et al, (2004) supra; Ronchetti S et al, (2002) Blood 100: 350-352; Li Z et al., (2003) J Autoimmun 21: 83-92), при этом в клетках CD4⁺ отмечается более высокий уровень экспрессии GITR, чем в клетках CD8⁺ (Kober J et al., (2008) Eur J Immunol 38(10): 2678-88; Bianchini R et al., (2011) Eur J Immunol 41(8): 2269-78).

Роль GITR человека в модулировании иммунных ответов показывает, что он может быть подходящей мишенью для терапии, основанной на антителах, для таких заболеваний, как злокачественное новообразование. Антитела к GITR описаны (например, в WO 200610502, WO 2011028683, WO 2015031667, WO 20150353637, WO 2015187835, WO 2015184099, US 9255151 и US 9255152), но существует насущная потребность в новых агентах и способах модуляции активности GITR против таких заболеваний, как злокачественное новообразование.

Раскрытие сущности изобретения

В настоящем документе предлагаются антитела, специфически связывающиеся с GITR, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны соответствующие полинуклеотиды, способные кодировать предложенные GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Более того, описаны способы использования предложенных антител и антигенсвязывающих фрагментов. Например, в связи с той ролью, которую GITR играет в процессе модуляции иммунного ответа, GITR-специфические антитела можно использовать для лечения различных заболеваний или расстройств, свя-

занных с GITR, при которых желательна модуляция иммунного ответа. Например, GITR-специфические антитела могут использоваться в самых различных вариантах иммунотерапии, таких как лечение разнообразных форм злокачественных новообразований.

GITR-специфические антитела

В настоящем документе описываются выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфические в отношении GITR. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с GITR человека. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с GITR человека и GITR яванского макака. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, включающим в себя один или более остатков из внеклеточного домена (ECD) GITR, как указано в SEQ ID NO:59. Такое GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с GITR с аффинностью связывания 30 нМ или меньше, могут индуцировать повышение экспрессии люциферазы при анализе гена люциферазы NF-κB и могут индуцировать ADCC *in vitro* с EC₅₀, равной 67 нг/мл или меньше.

В табл. 1 представлена сводная информация о примерах некоторых GITR-специфических антител, описанных в настоящем документе.

Таблица 1. Последовательности CDR mAb, сконструированных против GITR человека (SEQ ID NO:)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
TRGB5	GFTFSGYW (1)	ISGSGGST (5)	AKDFYWDADFY (12)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB14	GFTFSSYA (2)	ISGSGGST (5)	AKPIRGLDY (13)	QSVNMF (29)	DAS (32)	QQGFNAPLT (36)
TRGB20	GFTFSGYW (1)	ISSDGGSK (6)	AKEVVYDHYAALDY (14)	QSVNSF (30)	YAS (33)	QYIRWPLT (37)
TRGB23	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHGNLHFNLDY (15)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB25	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHRRFWLDY (16)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB190	GYSFTSYW (4)	IDPSDSDT (8)	ARVFPYGLVLDY (17)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB34	GYSFTSYW (4)	IYPGSDT (9)	ARDYGWHDFDY (18)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB35	GYSFTSYW (4)	IDPGSDT (10)	ARHRWSTSLLDY (19)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB120	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARPRNTNELDY (20)	QSISSY (31)	AAS (34)	QSYSTPLT (38)
TRGB127	GGTFSSYA (3)	IIPIFGNA (11)	ARHVYKRGVLNY (21)	QSISSY (31)	AAS (34)	QSYSTPLT (38)
TRGB134	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHRWGSGLDY (22)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB144	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHGFRGYLDY (23)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB153	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHAWLGHLDY (24)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB159	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHGRNSGLDY (25)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB160	GFTFSNYW (27)	ISGSGGST (5)	AKDFYWDSFDY (26)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB191						
TRGB191. CLF						
TRGB162	GGTFSSYA (3)	IIPIFGNA (11)	ARHVYKRGVLNY (21)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)

В некоторых вариантах осуществления предлагается GITR-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1.

Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Эти изотипы имеют более чем 95% гомологию по аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями по аминокислотному составу и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC и ADCP область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например, природных киллеров и макрофагов, что приводит к лизису и фагоцитозу клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетки-мишени, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности. Антитела, описанные в настоящем документе, включают антитела с описанными особенностями вариативных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

В некоторых вариантах осуществления антитела содержат области CDR антител, представленных в табл. 1 выше. В некоторых вариантах осуществления описанные антитела способны связываться с GITR

с константой диссоциации 30 нМ или менее, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В некоторых вариантах осуществления описанные антитела в состоянии индуцировать увеличение экспрессии люциферазы при анализе гена люциферазы NF-κB. В некоторых вариантах осуществления описанные антитела в состоянии индуцировать ADCC *in vitro* с EC₅₀, составляющей 67 нг/мл или меньше.

Наряду с описанными GITR-специфическими антителами и антигенсвязывающими фрагментами также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, *E. coli*). Также приводится процесс продукции описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Способы применения GITR-специфических антител Кроме того, описаны способы в которых используются описанные GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Конкретные антитела, использующиеся в способах, описанных в данном разделе, включают антитела с набором CDR, описанным для антител в табл. 1. Например, ключевая роль, которую GITR играет в иммунном ответе, делает его привлекательной мишенью для иммунотерапии, включая индуцирование или усиление иммунного ответа против желательных опухолевых антигенов или патогенных антигенов (например, вирусов и других патогенных организмов). Таким образом, GITR-специфические антитела находят применение в лечении различных форм злокачественных новообразований и инфекционных заболеваний.

Как отмечалось выше, активация GITR приводит к передаче одновременно активирующего сигнала на CD4+ и CD8+ Т-клетки и препятствует подавлению иммунного ответа регуляторными Т-клетками. Таким образом, в одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело вводится для ингибирования подавления активности эффекторных Т-клеток регуляторными Т-клетками. Анализ такого ингибирования может производиться самыми различными способами, известными специалистам в области, в том числе, например, посредством контроля пролиферации Т-клеток, экспрессии известных маркеров активации или секреции цитокинов. В другом варианте осуществления GITR-специфическое антитело вводится индивиду для снижения уровня регуляторных Т-клеток, например уровня опухолевых регуляторных Т-клеток. В еще одном варианте осуществления активность эффекторных Т-клеток индуцируется или усиливается посредством введения GITR-специфического антитела, как описано в настоящем документе. Конкретные методы анализа для каждого из перечисленных способов приведены в разделе "примеры".

Наборы GITR-специфических антител

В настоящем документе описаны наборы, включающие описанные GITR-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов, в которых используются GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для обнаружения наличия GITR в биологической пробе. Соответственно, описанные наборы могут включать одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются, инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A-1C. Активность агониста, проявляемая анти-GITR mAb по результатам стандартной панели скрининга. Приведенные данные представляют собой сигнал Cell-Titer Glo от клеток, которые обрабатывались указанным реагентом после трансфекции либо одного только репортерного гена люциферазы NF-κB (Luc), либо вектора экспрессии GITR с репортерным геном люциферазы NF-κB (GITR-Luc). Антитела, которые продуцировали сигнал, превышающий наблюдаемый для PBS, предварительно относили к категории агонистов.

Фиг. 2A-2E. Активность агониста, проявляемая анти-GITR mAb по результатам панели секвенирования следующего поколения. Приведенные данные представляют собой сигнал Cell-Titer Glo от клеток, которые обрабатывались указанным реагентом после трансфекции либо одного только репортерного гена люциферазы NF-κB, либо вектора экспрессии GITR с репортерным геном люциферазы NF-κB.

Фиг. 3A-3D. Эффект лигирования анти-GITR антитела на активность NF-κB. Приведенные результаты отражают активность SEAP как показателя активации NF-κB в клетках HEK-Blue NF-κB, стабильно трансфицированные GITR. Клетки обрабатывали различными концентрациями анти-GITR антитела в отсутствие (3A, 3B) или в присутствии (3C, 3D) 25 нг/мл растворимого лиганда GITR. Среда и

CNTO3930 использовались в качестве контроля без антитела и с изотипическим антителом.

Фиг. 4А и 4В. Эффект воздействия анти-GITR антител на ответы Т-клеток памяти на CMV и TT. Серореактивные РВМС промывали антигеном CMV и TT в отсутствие или в присутствии анти-GITR антител, антитела изотипического контроля CNTO3930 или в отсутствие антитела. Супернатант отбирали и анализировали на присутствие IFN γ .

Фиг. 5А и 5В. Противоопухолевая активность единичного агента для суррогатного анти-GITR антитела (DTA-1) в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38. DTA-1 или изотипическое крысиное IgG2b вводили 200 мкг/мышь животным в дни, помеченные черными стрелками (n=10 на группу), начиная с момента, когда объемы опухолей достигали 100 мм³. Введение DTA-1 приводило к полной регрессии опухоли у 5/10 животных.

Фиг. 6А-6С. Комбинация суррогатного анти-GITR антитела (DTA-1) и анти-PD-1 антитела (RMP1-14) приводит к синергической противоопухолевой активности в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38. Изотипическое крысиное IgG2b (6А), DTA-1 (6В) или DTA-1+RMP1-14 (6С) вводили по 100 мкг/антитело/мышь животным в дни, помеченные черными стрелками (n=10 на группу), начиная с момента, когда объемы опухолей достигали 200 мм³. Комбинированное лечение приводило к регрессии опухоли у 5/10 животных.

Фиг. 7А-7С. Комбинация суррогатного анти-GITR антитела (DTA-1) и анти-CTLA-4 антитела (9D9) приводит к синергической противоопухолевой активности в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38. Изотипическое крысиное IgG2b (7А), DTA-1 (7В) или DTA-1+9D9 (7С) вводили по 100 мкг/антитело/мышь животным в дни, помеченные черными стрелками (n=10 на группу), начиная с момента, когда объемы опухолей достигали 200 мм³. Комбинированное лечение приводило к регрессии опухоли у 3/10 животных.

Фиг. 8А-8D. Комбинация суррогатного анти-GITR антитела (DTA-1) и анти-OX-40 антитела (OX-86) эффективнее введения одного только OX-86 в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38. Три инъекции изотипического крысиного IgG2b (8А) или DTA-1 (8В) вводили по 100 мкг/антитело/мышь животным в дни, помеченные черными стрелками (n=10 на группу), начиная с момента, когда объемы опухолей достигали 200 мм³. Секвенирование DTA-1 (d1) с последующим введением OX-86 (d5, d9, фиг. 7D) было эффективнее, чем изотипическое Ab с последующим введением OX-86 (7С).

Фиг. 9А-9F. Комбинированная терапия анти-GITR/анти-PD-1 с вакцинированием стимулирует экспансию, функционирование и дифференцировку Ag-специфических CD8⁺ Т-клеток. Интактных мышей В6 без опухоли (n=5/группа) однократно иммунизировали пептидом OVA₂₅₇₋₂₆₄ (день 0) наряду с моно- или комбинированной терапией: 200 мкг анти-GITR или контрольное крысиное IgG в дни 0, 3 и 6 и 200 мкг анти-PD-1 в дни 3, 6, 9 и 12. Желательные иммунные ответы контролировали на день 7 (d7) и день 14 (d14) в крови и/или селезенке. А, анализ ELISpot IFN γ -секретирующих Т-клеток из селезенки мышей, стимулированных OVA₂₅₇₋₂₆₄-специфическим пептидом (d7). В, столбиковый график отображает полифункциональные субпопуляции однократно, дважды и трижды положительных CD8⁺ Т-клеток, выделяющих эффекторные цитокины IFN γ , TNF α и IL-2 в ответ на стимулирование OVA₂₅₇₋₂₆₄ в селезенке (d7). С, профиль цитолитического фенотипа (d7). D, OVA-специфические CD8⁺ Т-клетки в периферической крови в d7. Точечные графики, отражающие данные для 5 мышей, приведенные в D. E, OVA-специфические CD8⁺ Т-клетки в периферической крови в d14. E-F, дифференцировка OVA тетрамер-специфических CD8⁺ Т-клеток памяти в крови, взятой у получавших лечение мышей на d14 после иммунизации. Каждый из приведенных выше экспериментов повторяли по меньшей мере два раза со сходными результатами. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего (ст.ош.ср.). EM: эффекторные клетки памяти; CM: центральные клетки памяти.

Фиг. 10А-10D. Комбинированная терапия in vivo в сочетании с вакцинированием способствует отторжению опухоли B16-OVA у мышей. А, для развившихся опухолей B16-OVA (~30-40 мм³) проводили лечение указанными препаратами. В, осуществляли контроль по времени для ответа индивидуальных опухолей, групповых измерений опухолей (среднее +/- ст.ош.ср., С) и выживания (D). График отражает средний объем опухоли по группам исследованных животных, и на диаграмме приводится показатель без опухоли/всего (С). На графиках представлены результаты 1 из 3 независимых экспериментов. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Фиг. 11А-11D. Комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 обеспечивает синергический эффект усиления частоты и функции индуцированных вакциной антиген-специфических ответов CD8⁺ TIL. Приводятся сводные данные окрашивания внутриклеточных цитокинов для IFN γ , TNF α , IFN γ /TNF α и CD107a/IFN γ в CD8⁺ TIL после стимулирования рестриктированным пептидом OVA₂₅₇₋₂₆₄ (CD8) (А-В) или стимулирования РМА/ION (D) через 12-15 дней после имплантации опухоли. С, столбиковый график отражает процентные доли H2-K^b-SIINFEKL-рестриктированных OVA тетрамер-специфических CD8⁺ TIL от всех CD45⁺ клеток в опухоли. Эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с похожими результатами. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Интервалы ошибок отражают стандартную ошибку среднего для n=4-5/группа.

Фиг. 12А-12D. Комбинированная терапия увеличивает инфильтрацию CD8⁺ Т-клеток и снижает ча-

стоту Treg в опухолях B16-OVA. А, процентные доли Treg, определяемые по пробам селезенки мышей без опухоли из фиг. 9B-D, когорты мышей с опухолью B16-OVA получали комбинации Vax, анти-GITR или -PD-1 (как на фиг. 10). В, CD8⁺ TIL в процентах от всех CD45⁺ клеток через 15 дней после имплантации опухоли. С-D. Репрезентативные точечные графики результатов проточной цитометрии и сводные данные отражают процентную долю Treg для CD45⁺ TIL и отношение CD8⁺ эффекторных Т-клеток к Treg в опухолях получавших лечение мышей через 15 дней после имплантации опухоли. Результаты статистических анализов сопоставляли с Vax/анти-GITR/анти-PD-1. Результаты отражают данные 2-3 независимых экспериментов с 4-5 мышами в каждой группе. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Планки погрешностей указывают на ст.ош.ср.

Фиг. 13A-13D. Эффективность Vax/анти-GITR/анти-PD-1 зависит от CD8⁺ Т-клеток, и лечение индуцирует долгосрочную память. А. Схема дозирования для исследования терапевтического истощения. Мышам B6 (n=10/группа) вводили п/к 4×10⁵ опухолевых клеток B16-OVA, и когда диаметр опухолей достигал ~40 мм³, сокращали популяцию CD8 клеток, CD4 клеток или NK клеток введением по 200 мкг/мышь mAb в дни 7, 8, 9, 11, 14, 17; день 8 был днем начала лечения с Vax/анти-GITR/анти-PD-1 или IgG. Вакцину вводили в день 8; анти-GITR в день 8 и 14; анти-PD-1 в день 10, 13, 16 и 19 после имплантации опухоли. В, объем опухоли контролировали дважды в неделю (среднее +/- ст.ош.ср.). С-D, мышам без опухоли (n=6-9 в каждой группе) после комбинированного лечения повторно вводили клетки B16-OVA (2×10⁵; С) или B16.F10 (1,5×10⁵; D) в тот же бок через шесть месяцев после отторжения первичной опухоли. В качестве контроля при повторном введении использовали мышей сопоставимого возраста. Результаты отражают данные, полученные в ходе 2-3 независимых экспериментов.

Фиг. 14A-14D. Комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 приводит к экспансии специфических для опухоли CD8⁺ TIL и индуцирует элиминирование опухоли, опосредованное KLRG1⁺ CD8⁺ эффекторными Т-клетками памяти. А, репрезентативные графики разброса данных отражают процентные доли H2-K^b-SIINFEKL-рестриктированных OVA-специфических CD8⁺ Т-клеток, (В) процентные доли KLRG1⁺CD8⁺ TIL, и (С) процентные доли тетрамер-связывающих KLRG1⁺CD8⁺ TIL через 15 дней после инокуляции опухоли (4-5 мышей/группа). D, мышам B6 (10 в каждой группе) п/к вводили 4×10⁵ B16-OVA опухолевых клеток, и в день 8, после того как диаметры опухолей достигали ~50 мм³, начинали лечение, так же как и на фиг. 13. 200 мкг aKLRG1 mAb вводили в дни 7, 8, 9, 11, 14, 17, 20; день 8 был днем начала лечения. Объем опухоли и выживание контролировали дважды в неделю. На всех графиках приводится среднее +/- ст.ош.ср. по меньшей мере для двух независимых экспериментов. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Фиг. 15А и 15В. Двойная комбинация анти-GITR/анти-PD-1 обеспечивает синергический эффект в сочетании с TRP2-пептидной вакциной для индуцирования регрессии развившихся B16-OVA опухолей. Мышам B6 (10 в каждой группе) п/к вводили 4×10⁵ B16-OVA опухолевых клеток; когда опухоли достигали ~50 мм³, начинали лечение. А, примерная схема проведения только TRP2-пептидного вакцинирования или в комбинации с анти-GITR/анти-PD-1 терапией (совпадающими изотипическими IgG) для мышей с опухолями B16-OVA. В, рост опухоли контролировали во времени, в группах (среднее +/- ст.ош.ср.), а также у отдельных мышей. Эксперименты проводили по меньшей мере два раза со сходными результатами. **P<0,01

Фиг. 16. Истощение популяции CD25⁺ клеток при комбинированной терапии Vax/анти-GITR/анти-PD-1 не подавляло или не усиливало эффективности опухоли. Комбинированную терапию и дозирование 200 мкг анти-CD25 проводили, как показано на фиг. 5А. Объем опухоли контролировали дважды в неделю (на графике отображаются среднее +/- ст.ош.ср.). Результаты отражают данные двух независимых экспериментов с 10 мышами в каждой группе.

Фиг. 17А-17С. Анти-KLRG1 антитело приводит к истощению популяции мишени KLRG1⁺CD8⁺. А-В, интактным мышам без опухоли вводили комбинацию Vax/анти-GITR/анти-PD-1 и изотипа, как на фиг. 9. Получавшим анти-KLRG1 мышам вводили 100 мкг анти-KLRG1 mAb на 2, 4 и 6 дни после вакцинации. Мышей умерщвляли в день 7 после вакцинации и собирали лимфоциты из крови и селезенки для оценки экспрессии CD8, KLRG1 и CD44. А, процентная доля CD8⁺ Т-клеток в селезенке после лечения анти-KLRG-1 антителом. В, репрезентативные графики данных проточной цитометрии, отражающие процентные доли KLRG1⁺CD8⁺ в крови и селезенке, и (С) сводные данные для частоты и/или суммарного числа клеток KLRG1⁺CD8⁺CD44⁺ и KLRG1⁺CD8⁺Tet⁺ клеток (левая и правая панели, соответственно) в крови и селезенке. Результаты отражают данные 2 независимых экспериментов с 5 мышами в каждой группе. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Планки погрешностей указывают на ст.ош.ср.

Фиг. 18А и 18В содержат пример роста опухоли (фиг. 12А) и выживания (фиг. 12В) мышей (n=10 в каждой группе), которым были имплантированы клетки B16-OVA (400 000), с последующим лечением либо анти-CD122 mAb 5H4 (вводили 5 раз с интервалами 2-3 дня), либо комплексом пептидной вакцины (1 доза), либо их комбинацией, как показано, на 7-й день после имплантации.

Фиг. 19А-19D. Приводится частота TIL, собранных на день 16 после имплантации B16-OVA (400 000 клеток), и процентная доля инфильтрирующих опухоль G-MDSCs (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻) (фиг. 13А), инфильтрирующих опухоль секретирующих цитокин IFNγ⁺TNFα⁺ CD8⁺ Т-клеток при ex-vivo стимуляции.

ровании OVA₂₅₇₋₂₆₄ пептидом (фиг. 13B), H2-K^b-SIINFEKL OVA-специфических CD8⁺ TIL (фиг. 13C) и инфильтрирующих опухоль Treg (CD4⁺CD44⁺FOXP3⁺CD25⁺) (фиг. 13D). aCD122: анти-CD122 моноклональное антитело. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

Фиг. 20A-20C. Демонстрирует, что терапия анти-CD122 усиливает индуцированные вакциной антиген-специфические ответы CD8⁺ Т-клеток в периферии мышей без опухоли: процентная доля H2-K^b-SIINFEKL-рестриктированных OVA-специфических CD8⁺ Т-клеток (фиг. 31A); процентная доля популяции CD8⁺CD122⁺ Т-клеток после введения анти-CD122 в крови мышей без опухоли (фиг. 31B), процентная доля популяции CD8⁺CD122⁺ Т-клеток после лечения опухоли у мышей с опухолью (фиг. 31C). aCD122: анти-CD122 моноклональное антитело; Vax: вакцина. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001. Планки погрешностей указывают на ст.ош.ср.

Фиг. 21A и 21B. Демонстрирует выживание мышей, которым были имплантированы клетки B16-OVA (400 000), с последующим введением анти-CD122 в комбинации с вакцинацией пептидом (3 дозы) (фиг. 32A). Мышам, получавшим вакцину/анти-CD122 на фиг. 32A, которые выжили и без опухолей, повторно вводили клетки B16-ova; на графике отображена процентная доля мышей с отторжением второй провокации опухоли (фиг. 32B).

Фиг. 22A и 22B. Демонстрирует рост опухоли и выживание интактных мышей (n=10 в каждой группе), которые получали имплантат клеток B16-OVA (400 000), с последующим лечением либо анти-CD122, либо анти-GITR, либо комбинацией анти-CD122 и анти-GITR, как показано, в день 4 после имплантации. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

Фиг. 23. Различия в уровнях дейтерирования для каждого сегмента GITR-CED в присутствии или в отсутствие TRGB191.CLF. Каждый блок соответствует пептидам, которые могут картироваться, и уровень обмена по сравнению с контролем через 60, 600, 3600 и 14 400 сек. Серые блоки: без защиты от дейтерирования; темно-серые блоки: высокая степень защиты при связывании mAb; светлосерые блоки: умеренная степень защиты при связывании mAb.

Фиг. 24. Структурная модель с пространственным заполнением мономера GITR ECD с эпитопом TRGB191, выделенным черным.

Фиг. 25A и 25B. Активность ADCC для TRGB191.CLF на первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках в состоянии покоя и в активированном состоянии. TRGB191.CLF и CNTO3930 (изотипическое контрольное антитело) оценивались с точки зрения активности ADCC на находящихся в состоянии покоя CD4⁺ (А, левая панель) и находящихся в состоянии покоя CD8⁺ Т-клетках (В, левая панель) или активированных CD4⁺ (А, правая панель) и CD8⁺ Т-клетках (В, правая панель). Процентная доля специфического лизиса приводится в форме среднее ± стандартная ошибка среднего (ст.ош.ср.). Отношения Е: Т приводятся в условных обозначениях. N=3 повторных эксперимента, n=12 на каждую точку данных. [Ab]=концентрация антитела.

Фиг. 26. Активность ADCC для TRGB191.CLF на клеточной линии JLN-3. TRGB191.CLF и CNTO3930 (изотипическое контрольное антитело) оценивались с точки зрения активности ADCC с использованием клеток-мишени JLN-3 и эффекторных клеток NK-92 158 V/V. Процентная доля специфического лизиса приводится в форме среднее ± стандартная ошибка среднего (ст.ош.ср.). N=6 повторных экспериментов, n=от 12 до 24 на каждую точку данных. [Ab]=концентрация антитела.

Фиг. 27. TRGB191.CLF и изотипическое контрольное антитело CNTO3930 оценивались с точки зрения активности ADCC на клетках-мишени JLN-3 и дифференцированных *in vitro* T_{reg} в качестве клеток-мишени с использованием эффекторных клеток NK-92 158 V/V. Процентная доля специфического лизиса приводится в форме среднее ± стандартная ошибка среднего (ст.ош.ср.). N=3 повторных эксперимента, n=12 на каждую точку данных. [Ab]=концентрация антитела, EC₅₀=полумаксимальная эффективная концентрация, V_{max}=максимальный лизис.

Фиг. 28A и 28B. Активность ADCC для TRGB191.CLF с использованием эффекторных клеток с высокой и низкой аффинностью полиморфизмов FcγRIIIA. TRGB191.CLF и CNTO3930 оценивались с точки зрения активности ADCC на клетках-мишени JLN-3 с использованием эффекторных клеток NK-92, экспрессирующих (А) высокоаффинный вариант 158V/V или (В) низкоаффинный вариант 158F/F. Процентная доля специфического лизиса приводится в форме среднее ± стандартная ошибка среднего (ст.ош.ср.). N=3 повторных эксперимента, n=12 на каждую точку данных. [Ab]=концентрация антитела, EC₅₀=полумаксимальная эффективная концентрация, V_{max}=максимальный лизис.

Фиг. 29. Лечение DTA-1+FGK4.5 приводит к более полной регрессии опухоли в модели MC38, начиная с объемов опухоли 100 мм³.

Фиг. 30. Лечение DTA-1+FGK4.5 приводит к более полной регрессии опухоли в модели MC38, начиная с объемов опухоли 230 мм³.

Фиг. 31. Лечение DTA-1+OX86 приводит к более полной регрессии опухоли в модели MC38, начиная с объемов опухоли 100 мм³.

Фиг. 32. Лечение DTA-1+RMP1-14 приводит к более полной регрессии опухоли в модели MC38, начиная с объемов опухоли 100 мм³.

Осуществление изобретения

Определения

В настоящем описании и формуле изобретения используются различные термины, относящиеся к аспектам описания. Такие термины должны иметь обычное для них значение в данной области, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать согласно приведенным в настоящем документе определениям.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, обозначение "клетка" включает в себя комбинацию двух или более клеток и тому подобное.

В контексте настоящего документа термин "около" при указании измеримой величины, такой как количество, продолжительность во времени и тому подобное, считается охватывающим отклонения до $\pm 10\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения приемлемы для реализации описанных способов. Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, характеристик, таких как молекулярная масса, условий реакции и тому подобное, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, указанные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от нужных свойств, которые требуется получить посредством настоящего изобретения. В самом крайнем случае, но не в качестве попытки ограничить применение теории эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере рассматриваться с учетом числа представленных значащих цифр и с использованием стандартных методик округления.

Хотя числовые диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем объекта изобретения, являются приблизительными, числовые значения, указанные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно вытекающие из стандартного отклонения, обнаруживаемого при соответствующих тестовых измерениях.

Термин "выделенный" означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т.е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были "выделены", включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. "Выделенные" нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты. В настоящем документе термин "выделенное" антитело или антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые, по существу, не содержат других антител или антигенсвязывающих фрагментов, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с GITR, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от GITR). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом GITR, может иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, от других видов (таких как видовые гомологи GITR).

Используемые в настоящем документе термины "глюкокортикоид-индуцированный TNFR-связанный белок" и "GITR" конкретно включают белок GITR человека, например, как описано в базе данных GenBank с учетным № AF241229, эталонная последовательность NCBI: NP_004186.1 и UniProtKB/учетный номер Swiss-Prot Q9Y5U5 (см. также Kwon et al. 1999, J. Biol. Chem. 274, 6056-6061). GITR также известен в научной литературе как AITR, CD357, TNFRSF18 и GITR-D.

Используемые в настоящем документе термины "лиганд GITR", "GITRL" и "GITR-L" относятся к глюкокортикоид-индуцированному лиганду TNFR-связанного белка. GITRL также известен, как индуцированный активацией TNF-связанный лиганд (AITRL), и входит в суперсемейство лигандов фактора некроза опухоли 18 (TNFSF18). Учетный № AF125303 в базе данных GenBank содержит пример последовательности нуклеиновой кислоты GITRL человека. В GenBank™ с учетным № NP_005083 и в Swiss-Prot с учетным № Q9UNG2 приводятся примеры аминокислотных последовательностей GITRL человека. В конкретном варианте осуществления GITRL представляет собой GITRL человека с SEQ ID NO:65.

"Антителом" называются все изоформы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD и IgY), включая различные мономерные, полимерные и химерные формы, если иное не указано особо. В частности, термин "антитело" охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb) и антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела.

"Антигенсвязывающие фрагменты" представляют собой любую белковую структуру, способную проявлять аффинность связывания с конкретным антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты, полученные любым известным методом, например ферментативным расщеплением,

пептидным синтезом и рекомбинантными методами. Некоторые антигенсвязывающие фрагменты состоят из частей интактных антител, сохраняющих антигенсвязывающую специфичность исходной молекулы антитела. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать по меньшей мере одну переменную область (переменную область тяжелой цепи или легкой цепи) или одну или более областей CDR антитела с известным связыванием с конкретным антигеном. Примеры приемлемых антигенсвязывающих фрагментов включают в себя, без ограничений, диатела и одноцепочечные молекулы, а также молекулы Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, отдельные легкие цепи антител, отдельные тяжелые цепи антител, химерные слияния цепей антител или CDR с другими белками, белковые каркасы, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, описанное в WO 2007059782, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов V.sub.H и C.sub.H1; Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov.; 21(11):484-90); антитело верблюжьего типа (камельид) или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan.; 5(1):111-24); выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и тому подобное. Для получения антигенсвязывающих фрагментов можно использовать все изотипы антител. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя неантительные белковые каркасы, в которые могут успешно встраиваться полипептидные сегменты в ориентации, придающей аффинность к данному интересующему антигену, такие как белковые каркасы. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным способом или в результате ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фраза "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент" может использоваться для обозначения того, что данный антигенсвязывающий фрагмент включает в себя один или более аминокислотных сегментов антитела, относящегося к указанной фразе.

Термины "CDR" и множественное число для "CDR" относятся к определяющей комплементарности области (CDR), при этом три такие области определяют связывающий характер переменной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3), и три определяют связывающий характер переменной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3). CDR вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела и разделены аминокислотными последовательностями, которые включают скелетные или каркасные области. Точное определение границ и протяженности CDR зависит от различных систем классификации и нумерации. Поэтому CDR можно различать с помощью нумераций по системе Kabat, Chothia, контактными или любым другим граничными определениями. Несмотря на различные границы, каждая из таких систем отличается определенной степенью перекрытия в той части, которая составляет так называемую "гиперпеременную область" в пределах переменных последовательностей. Таким образом, определения CDR в соответствии с такими системами могут отличаться по длине и граничным областям относительно прилегающей каркасной области. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901 (1987); and MacCallum et al., "Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography," J. Mol. Biol. 262:732 (1996)), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может классифицироваться как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации главной цепи, которую принимают антигенсвязывающие петли (CDR). В результате сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель обладают лишь ограниченным набором доступных конформаций. Каждую каноническую структуру можно охарактеризовать с помощью торсионных углов полипептидной основной цепи. Поэтому соответствующие петли между антителами могут иметь весьма сходные трехмерные структуры, несмотря на высокий уровень изменчивости аминокислотной последовательности в большинстве участков петель (Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Chothia et al., "Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions," I 342:877 (1989); Martin and Thornton, "Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies," J. Mol. Biol. 263:800 (1996)), каждая из которых полностью включена путем ссылки. Более того, существует определенная взаимосвязь между сформированной петлевой структурой и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация определенного канонического класса определяется длиной цепи и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в петле, а также в пределах консервативного каркаса (то есть вне петли). Поэтому отнесение к конкретному каноническому классу может производиться на основании наличия таких ключевых аминокислотных остатков.

Термин "полипептид" используется взаимозаменяемо с термином "белок" и в своем наиболее широком смысле относится к соединению с двумя или более субъединичными аминокислотами, аминокислотными аналогами или пептидомиметиками. Субъединицы могут быть связаны пептидными связями. В другом варианте осуществления субъединица может быть связана другими связями, например сложно-

эфирными, эфирными и пр. При использовании в настоящем документе термин "аминокислота" относится к природным и/или искусственным, или синтетическим аминокислотам, включая глицин, а также D и L оптические изомеры, аналоги аминокислот и пептидомиметики. Пептид, состоящий из трех или более аминокислот, обычно называют олигопептидом, если пептидная цепочка достаточно короткая. В случае длинной пептидной цепи пептид обычно называют полипептидом или белком. Термин "специфически связывается" или "связывается специфическим образом", или их производные при использовании в контексте антител или фрагментов антител относится к связыванию посредством доменов, кодируемых генами иммуноглобулина, с одним или более эпитопов представляющего интерес белка без предпочтительного связывания других молекул в образце, содержащем смешанную популяцию молекул. Как правило, антитело связывается с родственным антигеном с K_d менее около $1 \times 10^{-8} M$, по результатам измерения в анализе по методу поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. Такие фразы, как "[антиген]-специфическое" антитело (например, G1TR-специфическое антитело) означают, что упомянутое антитело специфически связывается с упомянутым антигеном.

Термин "полинуклеотид", который является синонимом термину "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, "полинуклеотидом" называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин "полинуклеотид" также включает в себя ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. "Модифицированные" основания включают в себя, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин "полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

"Вектор" представляет собой репликон, такой как плазида, фаг, космида или вирус, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия указанного сегмента.

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В конкретных вариантах осуществления термин "клетка-хозяин" относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и к потомкам или к потенциальным потомкам такой клетки. Потомки такой клетки могут не быть идентичными родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например по причине мутаций или воздействия окружающей среды, которые могут проявляться в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина. Термины "экспрессия" и "продукция" используются в настоящем документе как синонимы и обозначают биосинтез продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывают все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения.

Экспрессия или продукция антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить внутри цитоплазмы клетки или во внеклеточной среде, например в ростовой среде для культивирования клеток. Значение термина "по существу такой же" может отличаться в зависимости от контекста, в котором он используется. Вследствие того, что в природной последовательности легких и тяжелых цепей и кодирующих их генов возможны вариации, как ожидается, можно встретить определенный уровень вариаций в пределах аминокислотных последовательностей или генов, кодирующих антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, которые практически не влияют на их уникальные свойства связывания (например, специфичность и аффинность). Такое ожидание отчасти обусловлено вырожденностью генетического кода, а также эволюционной успешностью консервативных вариантов аминокислотных последовательностей, которые ощутимо не меняют природу кодируемого белка. Соответственно, в контексте нуклеотидных последовательностей "по существу такой же" означает по меньшей мере 65% идентичность между двумя или более последовательностями. Предпочтительно термин относится по меньшей мере к 70% идентичности между двумя или более последовательностями, более предпочтительно по меньшей мере 75% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 80% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 91% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 92% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 93% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 94% идентичности, более предпочтительно по

меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 96% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности и более предпочтительно по меньшей мере 99% или более идентичности. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии=кол-во идентичных положений/общее кол-во положений×100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, вводимого для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, например, с помощью алгоритма, описанного в публикации E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя весовую таблицу остатков PAM120 со штрафом за длину гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме этого, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить, используя алгоритм, описанный в публикации Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Степень вариации, возможная в пределах аминокислотной последовательности белка без существенного влияния на функцию белка, намного ниже, чем в нуклеотидной последовательности, поскольку принципы вырожденности не применимы к аминокислотным последовательностям. Соответственно, в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента "по существу такой же" относится к антителу или антигенсвязывающим фрагментам, имеющим 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность описанным антителам или антигенсвязывающим фрагментам. Другие варианты осуществления включают в себя GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, основу или другие несвязывающиеся области, которые не обладают существенной идентичностью с антителами и антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, но обязательно включают в себя одну или более CDR или других последовательностей, необходимых для осуществления связывания, которые обладают 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с последовательностями, описанными в настоящем документе.

"Аффинность связывания" обычно относится к прочности полной суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером связывания (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в настоящем документе термин "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между участниками пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y может обычно определяться константой диссоциации (K_D). Аффинность может измеряться и/или выражаться самыми различными способами, известными специалистам в области, в том числе, без ограничений, посредством равновесной константы диссоциации (K_D) и равновесной константы ассоциации (связывания) (K_A). K_D рассчитывается из отношения k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывается из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} могут определяться методами, известными специалистам в области, например, поверхностным плазмонным резонансом.

Термин "индивид" означает человека и не относящихся к человеку животных, включая всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, например нечеловекообразных приматов, мышей, кроликов, овец, собак, кошек, лошадей, коров, цыплят, амфибий и рептилий. Во многих вариантах осуществления описанных способов индивид представляет собой человека.

GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты

В настоящем документе описываются выделенные моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с GITR. Общая структура молекулы антитела содержит антигенсвязывающий домен, включающий в себя тяжелую и легкую цепи, и Fc-домен, который выполняет различные функции, включая фиксацию комплемента и связывание с рецепторами антител.

К описанным GITR-специфическим антителам или антигенсвязывающим фрагментам относятся все изотипы, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические мультимеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулинов. Описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также включают изотип IgY, по существу обнаруживаемый в сыворотке курицы или индейки и в желтке яйца курицы или индейки.

GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать из любого вида посредством рекомбинантных способов. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой их мышинные, крысиные, козы, лошадиные, свиные, коровьи, куриные, кроличьи, верблюжьи, ослиные, человеческие или химерные варианты. В целях введения человеку антитела или антигенсвязывающие фрагменты, полученных не от человека, можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются химерными. В настоящем документе термин "химерный" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере некоторую часть по меньшей мере одного переменного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как оставшиеся части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина не относящегося к человеку животного. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку животного, а все или по существу все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но будут включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в табл. 1. В настоящем документе описаны выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с GITR. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в настоящем документе в качестве примера, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается GITR-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:5, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:12, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35. Это GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать каркасные последовательности человека. Такое GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с GITR аффинностью 30 нМ или меньше, могут индуцировать повышение экспрессии люциферазы при анализе гена люциферазы NF-κB и могут индуцировать ADCC *in vitro* с EC₅₀, равной 67 нг/мл или меньше. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:39, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:55. Тяжелая цепь и легкая цепь антител, описанных в настоящем абзаце, подходят для введения в биспецифические конструкторы, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела к GITR.

В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:2, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:5, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:13, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:29, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:36. Это GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать каркасные последовательности человека. Такое GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с GITR аффинностью 30 нМ или меньше, могут индуцировать повышение экспрессии люциферазы при анализе гена люциферазы NF-κB и могут индуцировать ADCC *in vitro* с EC₅₀, равной 67 нг/мл или меньше. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:40, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:56. Тяжелая цепь и легкая цепь антител, описанных в настоящем абзаце, подходят для введения в биспецифические конструкторы, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела к GITR.

В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:6, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:14, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:30, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37. Это GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать каркасные последовательности человека. Такое GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с GITR аффинностью 30 нМ или меньше, могут индуцировать повышение экспрессии люциферазы при анализе гена люциферазы NF-κB и могут индуцировать ADCC *in vitro* с EC₅₀,

равной 67 нг/мл или меньше. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:63, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:55. Тяжелая цепь и легкая цепь антител, описанных в настоящем абзаце, подходят для введения в биспецифические конструкторы, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела к GITR.

В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:27, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:5, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:26, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35. Это GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать карманные последовательности человека. Такое GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с GITR с аффинностью 30 нМ или меньше, могут индуцировать повышение экспрессии люциферазы при анализе гена люциферазы NF-κB и могут индуцировать ADCC *in vitro* с EC₅₀, равной 67 нг/мл или меньше. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:64, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO:55. Тяжелая цепь и легкая цепь антител, описанных в настоящем абзаце, подходят для введения в биспецифические конструкторы, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела к GITR.

Также описываются выделенные полинуклеотиды, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с GITR. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты варибельных доменов, предлагаемые в настоящем документе, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки, также входят в объем описания. В некоторых вариантах осуществления, описанные полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, включают в себя варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных GITR-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Такие варианты могут включать в себя: (a) варианты, в которых один или более аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него, (c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель, и (d) варианты, в которых полипептид сливаются с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и тому подобное. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и тому подобное), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно изотип IgG1. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно, такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Описанные в настоящем документе GITR-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты имеют такие аффинности связывания к GITR, которые содержат константу диссоциации (K_D) менее приблизительно 30 нМ. Аффинность описанных GITR-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов может быть определена множеством способов, известных в данной области, таких как метод поверхностного плазмонного резонанса или способы, основанные на твердофазном ИФА. Анализы по измерению аффинности методом SPR включают в себя анализы, выполненные с использованием прибора BIACore 3000, причем анализ проводят при комнатной температуре (например, при темпе-

ратуре, составляющей или близкой к 25°C), причем антитела, способные связываться с GITR, захватывают на сенсорном чипе ВІАсоре при помощи антитела к Fc (например, козьего антитела, специфического к IgG Fc человека, производства Jackson ImmunoResearch laboratories, код товара 109-005-098) в количестве около 75 ОЕ с последующим сбором данных об ассоциации и диссоциации при скорости потока 40 мкл/мин.

Кроме того, предлагаются векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие последовательность, кодирующую интересующий полипептид, считаются входящими в объем данного описания. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (ВАС), искусственные дрожжевые хромосомы (УАС), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем описания, относятся синтетические, геномные или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролируемые терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников.

Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антиген-связывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актина, миозина человека, гемоглобина человека, мышечного креатина человека и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и подходят для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна - Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном из вариантов осуществления кодирующую последовательность GITR-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента помещают под контроль индуцибельного промотора, например промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или более стимулируемых интерфероном реагирующих элементов (ISRE), как промоторы протеинкиназы R 2',5'-олигоаденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и тому подобное.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть шиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т.е. путем введения "спейсерных" нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину), гены

глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для получения клеток, продуцирующих G1TR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, в другом аспекте изобретения описаны клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с G1TR, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные и подтвержденные примерами в настоящем документе.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и тому подобное (описано в публикации Cline, 29 Pharm. Ther. 69-92 (1985)). Для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, приемлемым для применения в экспрессии G1TR-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHOК1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и тому подобное. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Способы, в которых используются G1TR-специфические антитела для лечения

В настоящем документе предлагаются G1TR-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для терапевтического применения. В частности, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно применять при лечении злокачественных новообразований. Соответственно, в изобретении предлагается способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение антитела, описанного в настоящем документе, например, G1TR-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Ряд аспектов биологии G1TR делают его потенциальной мишенью для лечения различных форм злокачественных новообразований. Прежде всего, активация G1TR, как подробно описано выше, активирует иммунную систему. Кроме того, экспрессирующие G1TR эффекторные Т-клетки и регуляторные Т-клетки инфильтрируют опухоли многих видов, при этом экспрессия G1TR на клетках, не относящихся к гематопоэтическим, пренебрежимо мала или отсутствует. Такой профиль распределения означает, что экспрессирующие G1TR клетки могут концентрироваться в опухолях. Подобное сочетание активности и распределения вместе определяет привлекательность подхода использования G1TR в качестве мишени для лечения различных форм злокачественных новообразований. Антигенсвязывающие белки могут использоваться для лечения как солидных опухолей, так и гематологических форм злокачественных новообразований, включая лейкоз.

Антитела, используемые в этих способах, включают антитела, описанные выше в настоящем документе, такие как G1TR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент со свойствами, описанными в табл. 1, например с последовательностями CDR или переменных доменов, которые так-

же представлены в дальнейшем описании этих антител.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, иммуноэффекторное свойство GITR-специфических антител могут быть модулированы за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR) и тому подобное, могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность", или ADCC, представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, естественные киллерные (ЕК) клетки, нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания Fc.гамма.RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., *MAbs*; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение крысиной гибридной клеточной линии YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), введение малых интерферирующих РНК, особенно к гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004) или коэкспрессия бета-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и альфа-маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, ADCC, вызванную антителами к GITR, также можно усилить путем введения некоторых замен в область Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в патенте США № 6,737,056.

Фармацевтические композиции и введение

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат: а) эффективное количество GITR-специфического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения и б) фармацевтически приемлемый носитель, который может быть инертным или физиологически активным. В предпочтительных вариантах осуществления GITR-специфическое антитело представляет собой описанное выше GITR-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемые носители" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Примеры приемлемых носителей, разбавителей и/или эксципиентов включают в себя одно или более из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), декстрозы, глицерина, этанола и тому подобное, а также любую их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. В частности, соответствующие примеры приемлемого носителя включают в себя: (1) фосфатно-солевой буферный раствор по Дульбекко, pH около 7,4, содержащий или не содержащий от около 1 мг/мл до 25 мг/мл сывороточного альбумина человека, (2) 0,9% солевой раствор (0,9% мас./об. хлорида натрия (NaCl)) и (3) 5% (мас./об.) декстрозу; и он также может содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизирующий агент, такой как Твин 20®.

Композиции, описанные в настоящем документе, также могут содержать дополнительный терапевтический агент, являющийся необходимым для конкретного подлежащего лечению расстройства. Предпочтительно, чтобы GITR-специфическое антитело или фрагмент антитела и дополнительное активное соединение имели комплементарные виды активности, которые не влияют друг на друга отрицательным образом. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиоте-

рапевтический агент.

Композиции изобретения могут быть представлены в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, но предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и от терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции имеют форму растворов, пригодных для инъекции или инфузии. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, подкожный). В предпочтительном варианте осуществления выполняют внутривенное болюсное введение композиций изобретения, либо их вводят в виде непрерывной инфузии в течение некоторого периода времени. В другом предпочтительном варианте осуществления их вводят внутримышечно, подкожно, внутрисуставно, внутрь опухоли, около опухоли, в пораженную ткань или около пораженной ткани, чтобы они оказывали локальный и системный терапевтические эффекты.

Стерильные композиции для парентерального введения можно получать путем введения антитела, фрагмента антитела или конъюгата антитела настоящего изобретения в нужном количестве в подходящий растворитель с последующей стерилизацией посредством микрофльтрации. В качестве растворителя или носителя можно использовать воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и тому подобное, а также их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, в частности, смачивающие, изотонизирующие, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие агенты. Стерильные композиции для парентерального введения также можно получать в виде стерильных твердых композиций, растворяемых во время применения в стерильной воде или любой другой пригодной для инъекций стерильной среде.

GITR-специфическое антитело или фрагмент антитела также можно вводить перорально. В качестве твердых композиций для перорального применения можно использовать таблетки, пилюли, порошки (желатиновые капсулы, пакеты-саше) или гранулы. В этих композициях активный ингредиент в соответствии с изобретением в потоке аргона смешивают с одним или более инертными разбавителями, такими как крахмал, целлюлоза, сахароза, лактоза или диоксид кремния. Эти композиции также могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, одно или более смазывающих веществ, таких как стеарат магния или тальк, краситель, покрытие (таблетка с сахарным покрытием) или глазурь.

В качестве жидких композиций для перорального введения можно использовать фармацевтически приемлемые растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, такие как вода, этанол, глицерин, растительные масла или парафиновое масло. Эти композиции могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, смачивающие вещества, подсластители, загустители, ароматизирующие или стабилизирующие продукты.

Дозы зависят от желаемого эффекта, продолжительности лечения и применяемого способа введения; они по существу составляют от 5 до 1000 мг в сутки перорально для взрослых, при разовых дозах в диапазоне от 1 мг до 250 мг активного вещества. В целом соответствующую дозировку определяет врач в зависимости от возраста, массы тела и других факторов, специфичных для подлежащего лечению индивида.

В настоящем документе также предлагаются способы уничтожения Treg-клеток посредством введения нуждающемуся в этом пациенту GITR-специфического антитела с ADCC активностью, и которое в состоянии заставлять иммунные клетки уничтожать GITR-экспрессирующие Treg-клетки. В терапевтических целях можно использовать любые из GITR-специфических антител или фрагментов антител изобретения. В предпочтительных вариантах осуществления GITR-специфическое антитело представляет собой описанное выше GITR-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В предпочтительном варианте осуществления GITR-специфические антитела или фрагменты антител изобретения применяют для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих. В более предпочтительном варианте осуществления для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих применяют одну из вышеописанных фармацевтических композиций, содержащих GITR-специфическое антитело или фрагмент антитела изобретения. В одном из вариантов осуществления расстройство представляет собой рак. Было показано, что самые различные раковые опухоли содержат GITR-положительные иммунные клетки. Соответственно, такие опухоли являются особенно привлекательными мишенями. К таким опухолям относятся, например, меланома (в том числе злокачественная меланома стадии III и стадии IV), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких - NSCLC), рак головы и шеи, рак простаты, почечно-клеточная карцинома и колоректальный рак. В предпочтительных вариантах осуществления GITR-специфическое антитело представляет собой описанное выше GITR-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

К другим формам злокачественных новообразований, для которых может проводиться лечение с использованием антигенсвязывающих белков, без ограничений относятся рак молочной железы, рак простаты, эндометриальный рак, рак мочевого пузыря, рак почек, рак пищевода, рак яичек, рак яичников, рак мочевого пузыря, плоскоклеточная карцинома (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи - SCCHN), увеальная меланома, фолликулярная лимфома, рак шейки матки, рак головного мозга, рак

поджелудочной железы, рак печени, лимфома, болезнь Ходжкина, множественная миелома, рак ЖКТ и астроцитарный рак.

При лечении любой из перечисленных выше форм злокачественных новообразований предлагаемые способы лечения могут использоваться для дальнейшего подавления роста опухоли, индуцировать регрессию опухоли, увеличивать выживаемость без прогрессирования и/или продлевать общую выживаемость индивида, страдающего от опухоли. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфические антитела могут также отсрочивать или предотвращать начало метастазирования. Прогресс лечения может отслеживаться различными способами. Например, ингибирование может приводить к снижению размеров опухоли и/или уменьшать метаболическую активность в пределах опухоли. Оба этих параметра могут измеряться посредством, например, сканирования МРТ или ПЭТ. Ингибирование может также отслеживаться с помощью биопсии для подтверждения уровня некроза, гибели клеток опухоли и уровня васкуляризации в пределах опухоли. Степень метастазирования может отслеживаться посредством известных способов.

Соответственно, фармацевтические композиции изобретения применяются для лечения или предупреждения метастазирования при различных формах рака, включая без ограничений рак молочной железы, рак простаты, эндометриальный рак, рак мочевого пузыря, рак почек, рак пищевода, рак яичек, рак яичников, плоскоклеточную карциному (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи - SCCHN), увеальную меланому, фолликулярную лимфому, рак шейки матки, рак головного мозга, рак поджелудочной железы, рак печени, лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, рак ЖКТ и астроцитарный рак.

Аналогично в настоящем документе дополнительно предлагается способ ингибирования роста выбранных популяций клеток, включающий приведение экспрессирующих GITR иммунных клеток в контакт с эффективным количеством GITR-специфического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими агентами. В предпочтительных вариантах осуществления GITR-специфическое антитело представляет собой описанное выше GITR-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления дополнительным терапевтическим агентом является иммунотерапия, то есть иммуностимулирующий агент, который индуцирует или усиливает иммунный ответ. Такие агенты могут включать, например: 1) активаторы дендритных клеток, 2) адъюванты вакцин, 3) стимуляторы Т-клеток, 4) ингибиторы иммунологических контрольных точек, и 5) ингибиторы клеток-супрессоров, цитокинов и/или ферментов.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующим агентом является вакцина против рака. В дополнение к вакцинам против злокачественных новообразований, которые содержат связанные с раком антигена, к вакцинам, которые применяются в комбинации с GITR-специфическим антителом, без ограничений относятся, GM-CSF, вакцины на основе ДНК и клеточной основе, вакцины с дендритными клетками, рекомбинантные вирусные вакцины (например, вирус коровьей оспы) и вакцины с использованием белка теплового шока (HSP). К применяемым вакцинам также относятся опухолевые вакцины, например образованные из клеток меланомы; и они могут быть аутологичными или аллогенными. Вакцины могут создаваться на основе, например, пептидов, ДНК или клеток. В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело вводится в комбинации с CD8/CD4 Ag-специфической пептидной вакциной.

При клиническом применении терапевтически эффективное количество GITR-специфического антитела или антигенсвязывающего фрагмента вводят нуждающемуся в таком лечении индивиду. Например, GITR-специфические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для лечения раковых опухолей, которые содержат GITR-положительные иммунные клетки. В предпочтительных вариантах осуществления GITR-специфическое антитело представляет собой описанное выше GITR-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления индивид является млекопитающим, предпочтительно человеком. В некоторых вариантах осуществления GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде раствора, протестированного на стерильность.

Схемы дозировки при вышеописанных способах лечения и применения корректируют для обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно выполнить одно болюсное введение, ввести несколько разделенных доз в течение некоторого периода времени, либо дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить по показаниям терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут готовить в виде стандартных единиц дозирования для упрощения введения и унификации дозирования.

Эффективные дозировки и схемы дозирования GITR-специфических антител и фрагментов зависят от подлежащего лечению заболевания или состояния и могут быть определены специалистом в данной области. Не имеющим ограничительного характера примером диапазона терапевтического эффективного количества соединения настоящего изобретения является диапазон около 0,001-10 мг/кг, например около 0,001-5 мг/кг, например около 0,001-2 мг/кг, например около 0,001-1 мг/кг, например около 0,001, около 0,01, около 0,1, около 1 или около 10 мг/кг.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с более низких доз GITR-специфического антитела или фрагмента, входящих в фармацевтическую композицию, чем необходимо для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта. В целом приемлемой суточной дозой GITR-специфического антитела настоящего изобретения будет такое количество соединения, которое является наименьшей дозой, вызывающей терапевтический эффект. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное. В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело или фрагмент можно вводить путем инфузии в еженедельной дозе, рассчитанной в мг/м². Такие дозы, например, можно рассчитать на основании доз в мг/кг, описанных выше, согласно следующей формуле: доза (мг/кг)×70. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например от 3 до 5 раз. Введение можно осуществлять путем непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело или фрагмент можно вводить путем медленной непрерывной инфузии в течение длительного времени, например более 24 ч, чтобы уменьшить побочные токсические эффекты.

В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело или фрагмент можно вводить в еженедельной дозе, рассчитанной как фиксированная доза, вводимая до восьми раз, например от четырех до шести раз, один раз в неделю. Такую схему можно повторять один или более раз по мере необходимости, например, через шесть месяцев или двенадцать месяцев. Такие фиксированные дозы, например, могут быть основаны на вышеуказанных дозах в мг/кг в расчете на предполагаемую массу тела 70 кг. Дозу можно определять или корректировать, измеряя количество GITR-специфического антитела настоящего изобретения в крови после введения, например, путем получения биологической пробы и использования антиидиотипических антител, нацеленных на GITR-связывающую область GITR-специфических антител настоящего изобретения.

В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело или фрагмент можно вводить в виде поддерживающей терапии, например один раз в неделю в течение периода в шесть или более месяцев.

GITR-специфическое антитело или фрагмент можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития злокачественных новообразований, замедлить начало развития событий при прогрессировании злокачественных новообразований и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии злокачественных новообразований.

GITR-специфические антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными для лечения заболевания или состояния. Соответственно, в одном из вариантов осуществления лекарственное средство, содержащее антитело, предназначено для комбинирования с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические агенты без ограничений включают антинеопластические агенты, в том числе алкилирующие агенты, включая: азотистые иприты, например мехлоретамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; нитрозомочевины, например, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CCNU); Temodal™ (темозоламид), этиленимины/метилмеламин, например триэтиленмеламин (ТЕМ), триэтилен, тиофосфорамид (тиотепа), гексаметилмеламин (НММ, алтретамин); алкилсульфонаты, такие как бусульфан; триазины, например дакарбазин (DTIC); антимергаты, включая аналоги фолиевой кислоты, например метотрексат и триметрексат, аналоги пиримидина, например 5-фторурацил (5FU), фтордеоксиуридин, гемцитабин, цитозинарабинозид (AraC, цитарабин), 5-азацитидин, 2,2'-дифтордеоксицитидин, пуриновые аналоги, например б-мекраптопурин, б-тиогуанин, азатиоприн, 2'-деоксикоформицин (пентостатин), эритрогидроксинониладенин (EHNA), флударабина фосфат и 2-хлордеоксиаденозин (кладрибин, 2-CdA); природные продукты, включая антимитотические препараты, например паклитаксел, алкалоиды барвинка, в том числе винбластин (VLB), винкристин и винорелбин, таксотер, эстрамустин и эстрамустина фосфат; пиподфилотоксины, например этопозид и тенипозид; антибиотики, например актиномицин, D, дауномицин (рубидомицин), доксорубицин, митоксантрон, идарубицин, блеомицин, пликамицин (митрамицин), митомицин С и актиномицин; ферменты, например L-аспарагиназа; модуляторы биологического ответа, например интерферон-альфа, IL-2, G-CSF и GM-CSF; различные агенты, включая координационные комплексы платины, например цисплатин и карбоплатин, антраценодионы, например митоксантрон, замещенная мочевины, например гидроксимочевина, производные метилгидразина, в том числе N-метилгидразин (МН) и прокарбазин, адренкортикоидные супрессанты, например митотан (o,p-DDD) и аминоклотеимид; гормоны и антагонисты, в том числе адренкортикостероидные антагонисты, например преднизон и эквиваленты, дексаметазон и аминоклотеимид; Gemzar™ (гемцитабин), прогестин, например гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и мегестрола ацетат; эстрогены, например диэтилстильбэстрол и эквиваленты этинилэстрадиола; антиэстрогены, например тамоксифен; андрогены, включая, тестостерона пропионат и флуоксиместерон/эквиваленты; антиандрогены, например флутамид, аналоги

гонадотропин-высвобождающего гормона и лейпролид; и нестероидные антиандрогены, например флутамид. Методы терапии, мишенью которых является эпигенетический механизм, включая без ограничений ингибиторы гистондеацетилазы, деметилирующие агенты (например, Vidaza), и методы терапии с высвобождением факторов транскрипционной репрессии (ATRA) могут также комбинироваться с антителами GITR.

К дополнительным конкретным примерам химиотерапевтических агентов относятся таксол, таксены (например, доцетаксел и таксотер), модифицированный паклитаксел (например, Abraxane и Oraphio), доксорубин, Avastin®, Sutent, Nexavar и другие мультикиназные ингибиторы, цисплатин и карбоплатин, эпопозид, гемцитабин и винбластин. Специфические ингибиторы других киназ также могут использоваться в комбинации с антителами GITR, включая без ограничений ингибиторы пути MAPK (например, ингибиторы ERK, JNK и p38), ингибиторы PI3 киназы/АКТ и ингибиторы Pim. К другим ингибиторам относятся ингибиторы Hsp90, ингибиторы протеасом (например, Velcade) и ингибиторы различных механизмов действия, например Trisenox.

Такое комбинированное введение может быть одновременным, отдельным или последовательным, в любом порядке. При одновременном введении агенты можно вводить в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, в зависимости от ситуации.

В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело или его фрагмент вводится в комбинации с другим иммуномодулирующим агентом, и такой иммуномодулирующий агент может выбираться, например, из группы, состоящей из активатора дендритных клеток, такого как лиганд CD40 и антител к агонисту CD40, а также агентов, усиливающих презентацию антигена, агентов, усиливающих тропизм Т-клеток, ингибиторов связанных с опухолью иммуносупрессивных факторов, например, TGF-β (трансформирующий фактор роста бета) и IL-10.

Некоторые способы включают в себя введение GITR-специфического антитела или его фрагмента с адьювантом вакцины. К таким адьювантам, например, относятся IL-12 и различные агонисты Toll-подобного рецептора (TLR), в том числе CpG (агонист TLR 9), монофосфорил липид А (MPL - агонист TLR4), PolyI:C или PolyI:CLC (агонист TLR3) и ресикимод и 852A (агонисты TLR 7/8).

В рамках других терапевтических подходов GITR-специфическое антитело вводится в комбинации с факторами роста Т-клеток, такими как IL-15 и/или IL-17, или с активаторами подобных молекул. В сходных способах стимулятор Т-клеток сочетается с антителом GITR. К таким стимуляторам относятся агонисты 4-1BB, например агонист анти-4-1BB антител и 4-1BBL.

В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело или его фрагмент вводится с ингибитором контрольных точек Т-клеток, например молекулами, которые посылают ингибирующий сигнал иммунной системе. К примерам таких агентов относятся ингибиторы PD-1 или PD-L1 (B7-H1), например анти-PD-1 антитела, в том числе ниволумаб (Bristol-Myers Squibb) и пембролизумаб, также известный как MK-3475 (Merck), пидилизумаб (Curetech), AMP-224 (Amplimmune) и анти-PD-L1 антитела, в том числе MPDL3280A (Roche), MDX-1105 (Bristol Myer Squibb), MEDI-4736 (AstraZeneca) и MSB-0010718C (Merck). К другим ингибиторам контрольных точек относятся антагонисты CTLA-4, например анти-CTLA-4 антитела. Примером анти-CTLA4 антитела является Yervoy® (ипилимумаб), предлагаемый Bristol-Myers Squibb. К другим примерам CTLA-4 антител относятся тремелимумаб (Pfizer), тисилимумаб (AstraZeneca) и AMGP-224 (Glaxo Smith Kline).

В других способах GITR-специфическое антитело или его фрагмент вводится в комбинации с ингибитором фермента, который обладает иммуносупрессивным действием. Примером является 1-метилтриптофан (1MT), который представляет собой малую молекулу-ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы.

GITR-специфическое антитело или его фрагмент могут также использоваться в комбинации с T-VEC (талимоген лагерпарепвек), разработанного Amgen.

В некоторых вариантах осуществления GITR-специфическое антитело или его фрагмент вводится в комбинации с биспецифическим антителом. Биспецифическое антитело может ориентировать иммунную систему хозяина, в частности, цитотоксическую активность Т-клеток, против раковых клеток.

GITR-специфическое антитело или его фрагмент могут также использоваться в комбинации с различными формами таргетной терапии. К примерам таргетной терапии без ограничений относится использование терапевтических антител. Примеры антител без ограничений включают антитела, связывающиеся с белками клеточной поверхности Her2, CDC20, CDC33, муциноподобным гликопротеином и рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), присутствующим на клетках опухоли, OX40, PD-1, CD122, CD40, CTLA-4, а также при необходимости индуцирующие цитостатическое и/или цитотоксическое воздействие на клетки опухоли, демонстрирующие такие белки. К примерам таких антител также относятся HERCEPTIN® (трастузумаб), который может использоваться для лечения рака молочной железы и других форм злокачественных новообразований, и RITUXAN® (ритуксимаб), ZEVALIN™ (ибридумаб тиуксетан) и LYMPHOCIDE™ (эпратузумаб), которые могут использоваться для лечения неходжкинской лимфомы и других форм злокачественных новообразований. Ряд других примеров антител также включает панитумумаб (VECTIBIX®), ERBITUX® (IMC-C225); BEXXAR™ (иод-131-

тоситумомаб); ингибиторы KDR (рецептор киназного домена); анти-VEGF антитела и антагонисты (например, Avastin® и VEGAF-TRAP); антитела к VEGF рецептору и антигенсвязывающие области; анти-Ang-1 и -Ang-2 антитела и антигенсвязывающие области; антитела к Tie-2 и другим рецепторам Ang-1 и Ang-2; лиганды Tie-2; антитела к ингибиторам киназы Tie-2; ингибиторы Hif-1a и Campath™ (алемтузумаб). В некоторых вариантах осуществления агентами противораковой терапии являются полипептиды, которые селективно индуцируют апоптоз в клетках опухоли, в том числе без ограничений TNF-связанный полипептид TRAIL.

В одном из вариантов осуществления GITR-специфическое антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе, используется в комбинации с одним или более антиангиогенных агентов, которые уменьшают ангиогенез. К некоторым таким агентам без ограничений относятся антагонисты IL-8; Campath, B-FGF; антагонисты FGF; антагонисты Tek (Cerretti et al., публикация США № 2003/0162712; Cerretti et al., Патент США № 6413932, и Cerretti et al., Патент США № 6521424); агенты анти-TWEAK (к которым без ограничений относятся антитела и антигенсвязывающие области); растворимые антагонисты рецептора TWEAK (Wiley, Патент США № 6727225); домен дезинтегрин ADAM в качестве антагониста связывания интегрин с его лигандами (Fanslow et al., публикация США № 2002/0042368); анти-эфрин рецептор и анти-эфрин антитела; антигенсвязывающие области или антагонисты (патенты США №№ 5981245; 5728813; 5969110; 6596852; 6232447; 6057124); анти-VEGF агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают VEGF, или растворимые рецепторы VEGF, или их связывающие лиганд области), например Avastin® или VEGF-TRAP™, и агенты анти-VEGF рецептора (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются с ними), ингибирующие EGFR агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются с ними), например панитумумаб, IRESSA™ (гефитиниб), TARCEVA™ (эрлотиниб), анти-Ang-1 и анти-Ang-2 агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются с ними или их рецепторами, например, Tie-2/ТЕК), и ингибирующие агенты анти-Tie-2 киназы (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются и ингибируют активность факторов роста, например антагонисты фактора роста гепатоцитов (HGF, также известного, как рассеивающий фактор), и антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают его рецептор "c-met" (например, рилотумумаб и AMG 337, Amgen); антагонисты к PDGF-BB; антитела и антигенсвязывающие области к лигандам PDGF-BB; и ингибиторы киназы PDGFR.

К другим антиангиогенным агентам, которые могут применяться в комбинации с GITR-специфическим антителом или его фрагментом, относятся такие агенты, как ингибиторы MMP-2 (матричная металлопротеиназа 2), ингибиторы MMP-9 (матричная металлопротеиназа 9) и ингибиторы COX-II (циклооксигеназа II). Примеры подходящих ингибиторов COX-II включают CELEBREX™ (целекоксиб), валдекоксиб и рофекоксиб.

GITR-специфическое антитело или его фрагмент, как описано, могут также использоваться в комбинации с ингибитором фактора роста. К примерам таких агентов без ограничений относятся агенты, которые могут ингибировать ответ EGF-R (рецептор эпидермального фактора роста), например антитела EGF-R (например, панитумумаб (VECTIBIX®)), антитела EGF и молекулы, которые являются ингибиторами EGF-R; ингибиторы VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), например рецепторы VEGF и молекулы, которые в состоянии ингибировать VEGF; и ингибиторы рецепторов erbB2, например органические молекулы или антитела, которые связываются с рецептором erbB2, например HERCEPTIN® (Genentech, Inc.). Ингибиторы EGF-R, которые описаны, например, в патенте США № 5,747,498, WO 98/14451, WO 95/19970 и WO 98/02434.

В некоторых терапевтических приложениях, в частности, при метастазировании злокачественного новообразования в кости с негативным воздействием на кость, может быть целесообразно вводить GITR-специфическое антитело или его фрагмент с терапевтическим агентом, который препятствует дальнейшей потере костной массы или способствует восстановлению потерянной костной массы. Соответственно, GITR-специфическое антитело или его фрагмент могут вводиться вместе с терапевтически эффективным количеством агента, способствующего росту костной массы (анаболик), или агентом, препятствующим резорбции кости, в том числе без ограничений: костные морфогенетические факторы с обозначениями от BMP-1 до BMP-12; трансформирующий фактор роста-β и входящие в семейство TGF-β; факторы роста фибробластов от FGF-1 до FGF-10; ингибиторы интерлейкина-1 (в том числе IL-1ra, антитела к IL-1 и антитела к рецепторам IL-1); ингибиторы TNFα (в том числе этанерцепт, адалимумаб и инфликсимаб); ингибиторы лиганда RANK (включая растворимый RANK, остеопротегерин и антагонистические антитела, которые специфически связывают RANK или лиганд RANK, например, деносумаб (XGEVA®)), ингибиторы Dkk-1 (например, антитела к Dkk-1), парашитовидный гормон, простагландины группы E, бифосфонаты и упрочняющие костную ткань минеральные вещества, например, фтор и кальций. К анаболическим агентам, которые могут использоваться в комбинации с антителами GITR и их функциональными фрагментами, относятся парашитовидный гормон и инсулиноподобный фактор роста (IGF), при этом последний агент предпочтительно применяется в комплексе с IGF-связывающим

белком. Антагонист рецептора IL-1, подходящий для такой комбинированной терапии, описан в WO 89/11540, и подходящий растворимый TNF рецептор-1 описан в WO 98/01555. Примеры антагонистов лиганда RANK раскрываются, например, в WO 03/086289, WO 03/002713, патентах США № 6740511 и 6479635.

В одном из вариантов осуществления предлагаемый способ лечения злокачественного новообразования включает введение нуждающемуся в таком лечении индивиду терапевтически эффективного количества GITR-специфического антитела, как описано в настоящем документе, в сочетании с радиационной терапией. Лучевая терапия может включать облучение или соответствующее введение радиофармацевтических препаратов пациенту. Источник излучения может быть внешним или внутренним по отношению к получающему лечению пациенту (лучевая терапия может, например, представлять собой дистанционную лучевую терапию (EBRT) или брахитерапию (BT)). Радиоактивные элементы, которые можно использовать на практике для этих способов, включают в себя, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, иод-123, иод-131 и индий-111.

Способы детекции GITR

В настоящем документе предлагаются способы обнаружения GITR в биологической пробе путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают обнаружение GITR в биологической пробе путем приведения пробы в контакт с любым из GITR-специфических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт с более чем одним из GITR-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Например, пробу можно приводить в контакт с первым GITR-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а затем приводить в контакт со вторым GITR-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент не являются одним и тем же антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть прикреплено к поверхности, например поверхности многолуночного планшета, чипа, либо к сходному субстрату. В других вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ни к чему не прикреплены или не зафиксированы.

Описанные GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут облегчать обнаружение GITR посредством способов, описанных в настоящем документе. Специалисту в данной области хорошо известны многие подобные метки. Например, приемлемые метки включают в себя, без ограничений, радиоактивные метки, флуоресцентные метки, эпитопные метки, биотин, хромофорные метки, ECL-метки или ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и тому подобное.

Описанные GITR-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в разных анализах для обнаружения GITR в биологической пробе. Некоторые приемлемые анализы включают без ограничений вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрию, иммунопреципитацию, равновесный диализ, иммунодиффузию, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимию, цитометрию с помощью сортировки клеток флуоресцентной активацией (FACS) или твердофазным ИФА.

Наборы для обнаружения GITR

В настоящем документе предлагаются наборы для обнаружения GITR в биологической пробе. Эти наборы включают в себя одно или более GITR-специфических антител, описанных в настоящем документе, или их антигенсвязывающий фрагмент и инструкции по применению набора.

Предлагаемое GITR-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут находиться в растворе; быть лиофилизированными; прикрепленными к субстрату, носителю или планшету; или могут быть мечеными с возможностью обнаружения.

Описанные наборы также могут включать в себя дополнительные компоненты, используемые для осуществления способов, описанных в настоящем документе. В качестве примера наборы могут содержать средства для получения пробы от индивида, контрольной или эталонной пробы, например пробы от индивида с медленно прогрессирующим раком и/или индивида без злокачественного новообразования,

одно или более отделений для проб и/или материалы инструкций, в которых описано осуществление способов изобретения, и тканеспецифические контроли или стандарты.

Средства для определения уровня GITR могут, например, дополнительно включать в себя буферные растворы и другие реагенты, предназначенные для применения в анализе для определения уровня GITR. Инструкции могут представлять собой, например, печатные инструкции по выполнению анализа и/или инструкции по оценке уровня экспрессии GITR.

Описанные наборы также могут включать в себя средства для выделения пробы от индивида. Эти средства могут содержать один или более элементов оборудования или реагентов, которые можно использовать для получения текучей среды или ткани от индивида. Средства для получения пробы от индивида также могут представлять собой средства для выделения компонентов крови, таких как сыворотка, из пробы крови. Предпочтительно набор предназначен для применения у человека.

Примеры вариантов осуществления изобретения

Для лучшего и более полного описания объекта изобретения в данном разделе в виде нумерованного списка приведены примеры осуществления представленного объекта изобретения.

Ниже представлены варианты осуществления в виде нумерованного списка.

Варианты осуществления

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с GITR человека и содержат:

a) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:35;

b) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:29, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36;

c) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:30, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:33, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:37;

d) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:35;

e) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:35;

f) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:35;

g) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:35;

h) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:19, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32, и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:35;

i) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:31, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:34, и CDR3 легкой цепи с ами-

SEQ ID NO:58;

j) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:48, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:58;

к) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:49, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55;

l) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:50, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55;

m) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:51, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55;

n) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:52, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55;

o) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:53, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55;

p) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:54, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55;

q) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:63, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55; или

r) область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:64, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO:55.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, причем антитело специфически связывается с GITR человека за счет взаимодействия с GITR (SEQ ID NO:62) аминокислотные остатки:

a) 40-45 и

b) 75-79.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, которые связываются с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, причем такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с GITR человека с аффинностью связывания по меньшей мере 30 нМ, как показывают результаты измерений с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием экспериментальных условий, описанных в примере 9.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, причем такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент индуцирует повышение экспрессии люциферазы при анализе гена люциферазы NF-κB.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, причем такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент индуцирует ADCC *in vitro* с EC₅₀ менее чем около 67 нг/мл.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, которые представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека.

12. Антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, который представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, которые являются рекомбинантными.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, которые имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 имеет изотип IgG1.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с GITR человека или с GITR яванского макака.

17. Полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1.

18. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 17.

19. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 18.

20. Способ продукции антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

культивирование клетки-хозяина как описано в варианте осуществления 19, в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающей молекулы из культуры.

21. Способ ослабления симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по варианту осуществления 1 требующему этого индивиду в количестве, достаточном для ослабления симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния у индивида.

22. Способ по варианту осуществления 21, в котором индивид является человеком.

23. Способ по варианту осуществления 21, дополнительно включающий одно или более из следующего:

- a) проведение химиотерапии
- b) проведение радиационной терапии; или
- c) введение одного или более терапевтических агентов.

24. Способ по варианту осуществления 23, в котором дополнительным терапевтическим агентом является иммуностимулирующий агент.

25. Способ по варианту осуществления 24, в котором иммуностимулирующий агент выбирается из группы, состоящей из антитела к PD-1 антитела, антитела к CTLA-4, антитела к CD122, антитела к CD40, антитела к OX40 и CD8 Ag-специфической OVA пептидной вакцины.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Набор, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 и упаковку для него.

Примеры

Представленные ниже примеры приводятся в качестве дополнения к приведенному выше описанию и в целях лучшего понимания объекта изобретения, описанного в настоящем документе. Эти примеры не следует считать ограничивающими описанный объект изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и в свете этого специалистам в данной области будут очевидны различные модификации и изменения, которые следует включать в объем изобретения и которые можно вносить без выхода за рамки объема изобретения.

Пример 1. Материалы.

Молекулы GITR ECD.

Рекомбинантный (h) слитый белок GITR-Fc человека (R&D Systems, номер по каталогу 689-GR), соответствующий аминокислотам с 26 по 161 hGITR (SEQ ID NO:59). Белок биотинилировали для проведения исследований с фаговым пэннингом. Этот белок также использовали для измерений связывания и аффинности.

Линии GITR-клеток.

GITR экспрессировали в клетках HEK293F посредством трансфекции или лентивирусной трансдукции для подтверждения реакционной способности анти-GITR антитела, для тестирования фаговых панелей и панелей секвенирования следующего поколения и для проверки перекрестной реактивности действия GITR mAb против GITR яванского макака.

Трансфицированные клетки представляли следующие последовательности GITR:

GITR человека (SEQ ID NO: 60)

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDP
CCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCSTQFGFLTVPFGNKT
HNAVCVPGSPPAEPLGWLTIVLLAVAACVLLLTSACLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPVPPST
EDARSCQFPPEERGERSAEEKGRLGDLWV

GITR яванского макака (SEQ ID NO: 61)

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGKDARCCRVHPTTRCCRDYQSEECSEWDCVCVQPEFHCGNP
CCTTCQHHPCPSGQGVQPQKFSFGFRCVDCALGTFSRGHDGHCKPWTDCSTQFGFLTVPFGNKT
HNAVCVPGSPPAEPPGWLTIVLLAVAACVLLLTSACLGLHIWQLGSQPTGPRETQLLLEVPVPPST
EDASSCQFPPEERGERLAEKGRGLGDLWV

Клетки после лентивирусной трансдукции представляли следующие последовательности GITR:

GITR человека (SEQ ID NO: 62)

MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCR
DYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGG
HEGHCKPWTDCSTQFGFLTVPFGNKT
HNAVCVPGSPPAEPLGWLTIVLLAVAACVLLLTSACLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPVPPST
EDARSCQFPPEERGERSAEEKGRLGDLWV

GITR яванского макака (SEQ ID NO: 61)

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGKDARCCRVHPTTRCCRDYQSEECSEWDCVCVQPEFHCGNP
CCTTCQHHPCPSGQGVQPQKFSFGFRCVDCALGTFSRGHDGHCKPWTDCSTQFGFLTVPFGNKT
HNAVCVPGSPPAEPPGWLTIVLLAVAACVLLLTSACLGLHIWQLGSQPTGPRETQLLLEVPVPPST
EDASSCQFPPEERGERLAEKGRGLGDLWV

Транзиторную экспрессию клеток HEK293F проводили, помещая клетки в среду Freestyle™ 293 (Gibco № 12338) с плотностью $1e^6$ клеток/мл в объеме 30 мл во флаконы для встряхивания с вентилируемой крышкой объемом 125 мл при встряхивании при 130 об/мин в течение 24 ч до трансфекции. Трансфекцию осуществляли с использованием реагента Freestyle max (Invitrogen № 16447). Для разовой трансфекции 30 мл в отдельной пробирке 37,5 мкл реагента Freestyle Max разбавляли в 1 мл среды OptiMEM (Gibco № 31985). В отдельной пробирке 37,5 мкг ДНК (300 нанограммов целевой и 37,2 мкг плазмиды чужеродного носителя) смешивали в 1 мл OptiMEM. Содержимое двух пробирок затем смешивали вместе, инкубировали в боксе биологической безопасности в течение 1 минуты, а затем смесь добавляли непосредственно во флакон с клетками HEK293F. Через 48 часов роста клетки были готовы для использования в указанных анализах.

Лентивирусные частицы, представляющие GITR полной длины, готовили в Genescopeia (Genescopeia номер по каталогу LPP-U0202-LV105-200-S для GITR человека и Genescopeia номер по каталогу LPP-U0202-LV105-200-S для GITR яванского макака), трансдуцировали в клетки в соответствии с протоколом производителя. Трансдуцированные клетки отбирали для стабильной интеграции плазмиды, а затем отдельные клетки сортировали с использованием клеточного сортера BD Biosciences FACS Jazz. Поверхностную экспрессию GITR количественно оценивали проточной цитометрией при окрашивании с R&D Systems FAB689P анти-huGITR антителом и анализировали на BD Biosciences Accuri C6.

Пример 2. Обнаружение антител GITR с использованием технологии фагового дисплея.

Проводили пэннинг библиотек de novo pIX Fab (Shi, L., et al J Mol Biol, 2010. 397(2): pp.385-396. WO 2009/0854 62), содержащих библиотеки тяжелой цепи V_H1-69, 3-23 и 5-51 в паре с библиотеками легкой цепи V_K VLK3-20, VLK4-1, VLK3-11 и VLK1-39, относительно биотинилированного слитого GITR-ECD Fc человека в концентрации 100 нМ (циклы 1-3) или 10 нМ (цикл 4) в процессе селекции, подобном описанному в работах Rothe et al, J Mol Biol 376:1182-1200, 2008 и Steidl et al, Mol Immunol. 46: 135-144, 2008.

Ген pIX вырезали из фагемидной ДНК после четвертого раунда пэннинга и получали растворимые кодирующие Fab области с his-метками. Fab-фрагменты экспрессировали в E. coli и проводили скрининг на связывание с GITR методом ИФА. Вкратце, 96-луночные планшеты Nunc Maxisorp Plates (Nunc № 437111) были покрыты либо стрептавидином (Promega), либо овечьим Fd против человека (участок связывания № PC075) в PBS в концентрации 5 мкг/мл при температуре 4°C в течение ночи. Бактериальные культуры, содержащие вектор экспрессии Fab, выращивали в 1 мкл 2×YT (карбенициллин) в культуральных планшетах с глубокими лунками до образования мутности (ОП600≈0,6). Затем экспрессию Fab индуцировали путем добавления IPTG в концентрации 1 mM. Культуры растили в течение ночи при 30°C, а затем на следующий день очищали путем центрифугирования. Покрытые стрептавидином планшеты промывали трижды TBS, 0,5% Tween-20 (Sigma #79039-10ПАК), загружали биотинилированный GITR-Fc в количестве 5 мкг/мл и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. С помощью робота для работы с жидкостями Biomek (Beckman Coulter) покрытые анти-Fd планшеты Maxisorp и покрытые стрептавидином планшеты трижды промывали TBS, 0,5% Tween-20 (Sigma #79039-10ПАК) и блокировали 200 мкл PBS-Tween (0,5%)+обезжиренное сухое молоко (3%) на каждую лунку в течение одного часа при комнатной температуре. На этом и всех последующих этапах планшеты трехкратно промывали TBS с 0,5% твин-20 (Sigma № 79039-10ПАК). В каждую лунку вводили по 50 мкл супернатанта Fab, после чего инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После промывания добавляли 50 мкл козьего карра-HRP против человека (Southern Biotech) с разбавлением 1: 5000 в TBST с 0,3% молока, и планшеты инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли 50 мкл хемилюминесцентного субстрата PoD (Roche № 121-5829500001) согласно инструкциям производителя. Далее планшеты просканировали на люминесценцию на планшетном сканере Envision (Perkin Elmer). Для секвенирования ДНК отбирали клоны, которые были положительными по экспрессии по ИФА и по связыванию GITR по ИФА. В рамках такого процесса фагового пэннинга было обнаружено всего 50 уникальных последовательностей Fab. Уникальные V-области тяжелой цепи клонировали в векторы экспрессии человеческого IgG1_G1m(17,1), уникальные легкие цепи клонировали в векторы экспрессии каппа человека и полученные антитела тестировали на предмет активности связывания в ИФА.

Пример 3. Предварительное описание свойств антител GITR, полученных с использованием технологии фагового дисплея.

Анализ связывания GITR человека.

Связывание антител GITR со сконструированными клетками оценивали с использованием FACS. Цель данного скринингового анализа заключалась в идентификации антител, связывающихся с клетками, экспрессирующими hGITR.

Вкратце, 300000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет (Greiner bio one, номер по каталогу 651261) и клетки осаждали. Клетки промывали 100 мкл окрашивающего буфера FACS (BD Pharmingen Stain Buffer (BSA) номер по каталогу 554657), инкубировали при 4°C в течение 30 мин со смесью 50 мкл окрашивающего буфера FACS и 20 мкл на лунку неочищенных супернатантов антитела, после

чего однократно промывали 200 мкл окрашивающего буфера FACS. Для регистрации клетки в течение 30 минут инкубировали при 4°C с 50 мкл на лунку Alexa Fluor 488 козьего антитела к IgG (H+L) человека (Molecular Probes, номер по каталогу A11013) в концентрации 2 мкг на мл в окрашивающем буфере FACS. Клетки однократно промывали 200 мкл на лунку окрашивающего буфера FACS, ресуспендировали в 150 мкл на лунку окрашивающего буфера FACS, а затем переносили в пробирки для FACS, которые содержали 200 мкл на лунку окрашивающего буфера FACS. Затем проводили анализ FACS. Анализ повторяли для непротиворечивости данных и для дальнейшей разработки отбирали лучше всего связывающиеся молекулы.

Анализ гена люциферазы NF-κB.

Для оценки агонистической активности антител GITR проводили скрининг панели в рамках анализа гена люциферазы NF-κB. Вкратце, клетки HEK293 транзитивно трансфицировали репортерной плазмидой, кодирующей ген люциферазы, под контролем промотор NF-κB вместе с плазмидой экспрессии GITR человека. Клеткам давали восстановиться после трансфекции и экспрессировать GITR человека в течение четырех часов при 37°C, после чего можно было проводить анализ. Чтобы подтвердить соответствие результатов анализа ожидаемым, в лунки положительного контроля добавляли рекомбинантный лиганд GITR человека (R&D Systems 6987-GL/CF) в конечной концентрации 2,5 мкг на мл. В экспериментальные лунки добавляли тестируемые антитела к GITR в конечной концентрации 5 микрограмм на мл. Затем чашки инкубировали при 37°C в течение четырех часов. Ожидалось, что эффективная передача сигнала GITR активирует путь NF-κB с последующей экспрессией люциферазы, что может регистрироваться посредством добавления Steady Glo, как указано производителем (Promega номер по каталогу E2550), с измерением конечной люминесценции на считывающем устройстве для планшетов Envision (Perkin Elmer).

Пятнадцать антител индуцировали увеличение экспрессии люциферазы по сравнению с обработкой одним только PBS (фиг. 1). Антитела, которые приводили к увеличению экспрессии люциферазы по сравнению с обработкой одним только PBS, предварительно относили к категории агонистов, тогда как остальные антитела могли быть антагонистами или же могли просто связываться с GITR, не влияя на передачу сигнала.

Пример 4. Обнаружение антител GITR при секвенировании следующего поколения.

После обнаружения первого набора антител к GITR образцы ДНК по итогам последнего цикла фаговой селекции передавали в Beckman Coulter Genomics для секвенирования следующего поколения для V-областей тяжелой цепи с использованием платформы секвенирования Roche 454. Для исходных данных, полученных от Beckman Coulter Genomics, проводили предварительный анализ в IMGt, а затем более тщательно анализировали собственными силами с использованием принадлежащей Janssen компьютерной программы 3DX. Идея использования секвенирования следующего поколения для более детального анализа результатов фаговой селекции была недавно развита в метод, позволяющий увеличивать число и качество обнаруживаемых антител (Ravn et al, *Methods* 60 (2013) pg 99-110).

Последовательности, предоставленные IMGt, фильтровали для исключения образцов низкого качества, или образцов, содержащих стоп-кодона, а затем остальные последовательности сортировали по CDR3 тяжелой цепи. Такой подход выбирали, поскольку предполагалось, что CDR3 определяет наиболее существенную часть энергии связывания для антигена, и наибольшее разнообразие в фаговых библиотеках локализовано в CDR3 тяжелой цепи. Восемьдесят семь V-областей было выбрано для синтеза ДНК и клонирования в вектор IgG1 G1m(17) человека на основании частоты наблюдения и отсутствия цистеинов, метионинов или последовательностей с высокой гидрофобностью.

После синтеза предполагаемые тяжелые цепи анти-GITR тестировали на связывание с GITR, как было описано выше. Поскольку набор данных секвенирования последующего поколения не содержал данных о соответствующих партнерах легкой цепи для таких V-областей тяжелой цепи, тяжелые цепи совместно трансфицировались с каждым из 4 генов зародышевой линии легкой цепи, обнаруженных в фаговых библиотеках: Vk3-20, Vk4-1, Vk3-11 и Vk1-39. Неочищенные супернатанты антител из таких четырех стандартных трансфекций тестировали в ИФА на способность связываться с рекомбинантным слитым белком GITR ECD-Fc человека. Для дальнейшей разработки отбирали наиболее прочно связывающиеся соединения.

Пример 5. Предварительное описание свойств антител GITR, полученных при секвенировании следующего поколения.

После того как было продемонстрировано связывание анти-GITR mAb из набора секвенирования следующего поколения с гибридным белком GITR ECD-Fc в ИФА, часть набора тестировали на связывание с GITR клеточной поверхности, как описано в примере 3. Демонстрировавшие связывание тестировались на агонистическую активность с использованием анализа гена люциферазы NF-κB, как описано в примере 3. При концентрации 40 микрограмм в мл антитела, которые индуцировали увеличение экспрессии люциферазы, равное по меньшей мере 20% увеличению по сравнению с фоном, наблюдаемым при обработке природным лигандом, считались обладающими агонистической активностью (фиг. 2).

Пример 6. Кросс-реактивность для яванского макака.

Очищенные антитела после фагового дисплея и секвенирования следующего поколения тестировали на связывания с GITR яванского макака с использованием проточной цитометрии. Транзиторно трансфицированные клетки инкубировали при 2-8°C в течение 30 мин с 0,1 мг/мл тестируемых антител и инкубировали при 2-8°C в течение 30 мин с PE-меченным козым антителом к IgG человека. Затем клетки промывали и анализировали на проточном цитометре MACSQuant. Антитела, отнесенные к положительно связывающимся, демонстрировали сдвиг от 1,5 до 2 логарифмических единиц в средней интенсивности флуоресценции клеток, трансфицированных GITR человека или яванского макака по сравнению со средней интенсивностью флуоресценции клеток, трансфицированных пустым вектором. Результаты связывания сведены в табл. 2.

Таблица 2. Связывание антител к GITR с клетками HEK293f, транзиторно трансфицированных GITR человека или яванского макака. Отметим, что в данной таблице приводятся только антитела, которые демонстрировали связывание с клетками с GITR яванского макака - тестированные антитела, которые не приводятся, не демонстрировали связывания с GITR яванского макака. Антителам присваивалась оценка ++ в случае сильного сдвига кривой связывания и + в случае умеренного сдвига связывания.

	Связывание с	Связывание с
	GITR человека	GITR яванского макака
TRGB5	++	++
TRGB14	++	+
TRGB20	++	++
TRGB23	++	++
TRGB25	++	+
TRGB31	++	+
TRGB34	++	+
TRGB35	++	+
TRGB120	++	+
TRGB127	++	+
TRGB134	++	++
TRGB144	++	+
TRGB153	++	++
TRGB159	++	++
TRGB160	++	++
TRGB162	++	++

Таким образом, в итоге было продемонстрировано, что панель из 16 антител GITR - все они приводятся в табл. 3 связывается с GITR человека и яванского макака.

Таблица 3. Последовательности CDR 16 кандидатов GITR mAb, которые демонстрировали связывание по отношению к GITR человека и яванского макака (SEQ ID NO:)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
TRGB5	GFTFSGYW (1)	ISGSGGST (5)	AKDFYWDADFY (12)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB14	GFTFSSYA (2)	ISGSGGST (5)	AKPIRGLDY (13)	QSVNMF (29)	DAS (32)	QQGFNAPLT (36)
TRGB20	GFTFSGYW (1)	ISSDGGSK (6)	AKEVVYDHYAALDY (14)	QSVNSF (30)	YAS (33)	QQYIRWPLT (37)
TRGB23	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHGWLHFNLDY (15)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB25	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHRRFWLDY (16)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB31	GYSFTSYW (4)	IDPDSDT (8)	ARVFPYYGLVLDY (17)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB34	GYSFTSYW (4)	IYPGDSDT (9)	ARDYGWHDY (18)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB35	GYSFTSYW (4)	IDPDSDT (10)	ARHRWSTSLLDY (19)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB120	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARPRNTNELDY (20)	QSISSY (31)	AAS (34)	QQSYSTPLT (38)
TRGB127	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHVKRGLVNY (21)	QSISSY (31)	AAS (34)	QQSYSTPLT (38)
TRGB134	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHRWGSGLDY (22)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB144	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHGFQRYLDY (23)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB153	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHAWLGLDY (24)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB159	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (7)	ARHGRNSGLDY (25)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB160	GFTFSNYW (27)	ISGSGGST (5)	AKDFYWDSFDY (26)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)
TRGB162	GGTFSSYA (3)	IIPIFGTA (11)	ARHVKRGLVNY (21)	QSVSSY (28)	DAS (32)	QQRSNWPLT (35)

Области VH и VL для 16 G1TR mAb показаны ниже в табл. 4.

Таблица 4. Последовательности тяжелой и легкой цепи для 16 кандидатов G1TR mAb, которые демонстрировали связывание по отношению к G1TR человека и яванского макака

Идентификатор mAb	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO:
TRGB5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSGYWMWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDFYWDADFYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT	39	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYCQQRNWPFTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIAPP SDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT	55
	YICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK		LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
TRGB14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYAMWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKPIRGLDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	40	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVNFWLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYCQQGFNAPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIAPP SDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	56
TRGB20	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSGYWMWVRQAPGKG LEWVSGISSDGGSKYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKEVVYDHYAALDY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSKVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMIISRTPEV CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	41	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVNSFLAWYQQKP GQAPRLLIYASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYCQQYIRWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIAPP SDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	57
TRGB23	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYISWVRQAPGQG LEWMMGIIPIFGTANYAQKFGQ RVTITADESTSTAYMELSSLRS	42	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELP	55

	<p>EDTAVYYCARHGNLHFNLDYW GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK</p>		<p>EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>TRGB25</p>	<p>QQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMMGIIPITGTANYAQKFG RVTITADESTSTAYMELSSLR EDTAVYYCARHRRFWLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFPY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLSPGK</p>	<p>43</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>TRGB31</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KGGYFSTSYWIGWVRQMPGKG LEWMMGIDPSDSDTRYSPSFQG QVTISADKSI STAYLQWSSLKA SDTAMYYCARVFPYGLVLDYW GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT</p>	<p>44</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>

	QKSLSLSPGK			
TRGB34	EVQLVQSGAEVKKPGEESLKI KSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG LEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ QVTISADKSI STAYLQWSSSLKA SDTAMYICARDYGWHD FDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDK KVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWEWSNGQPENNYKTP PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	45	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASN RATGIPA RFGSGSGTDFTLTIS SLEP EDFAVYCCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	55
TRGB35	EVQLVQSGAEVKKPGEESLKI KSGYSFTSYWISWVRQMPGKG LEWMGIIDPGDS DTRYSPSFQ QVTISADKSI STAYLQWSSSLKA SDTAMYICARHRWSTSLLDY GQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTS GVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDK KVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPSPRDELTKNQVSLTCLVK FYPSDIAVEWEWSNGQPENNYKT TPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	46	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASN RATGIPA RFGSGSGTDFTLTIS SLEP EDFAVYCCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	55
TRGB120	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAI SWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARPRRNTNLDYWG QGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTS GVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDK KVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV	47	DIQMTQSPSSLSASVGRV ITCRASQSISSYL NNYQQK GKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTIS SLP EDFATYYCQSYSTPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	58

	<p>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK</p>			
TRGB127	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGNANYAQKFQG RVTITADEESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARHVKYKRGVLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKTHTCPPCPAPELGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK</p>	48	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTV ITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQ EDFATYYCQQSYSTPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	58
TRGB134	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQG RVTITADEESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARHRWGSGNLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKTHTCPPCPAPELGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK</p>	49	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISLLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	55
TRGB144	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQG RVTITADEESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARHGFQRGYLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL</p>	50	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISLLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ</p>	55

	<p>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDDKVEPK SCDKTHTCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK</p>		<p>ESVTEQDSKDYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	
TRGB153	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAI SWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARHAWLGHLDYWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDDKVEPKS CDKTHTCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>	51	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISILEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	55
TRGB159	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAI SWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARHGRNSGRLDYWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDDKVEPK SCDKTHTCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK</p>	52	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISILEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	55
TRGB160	<p>QVQLLESGLVQPGGSLRLS ASGFTFSNYWMSWRQAPGKGL WWSAISGSGGTYADSVKGRFT</p>	53	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA</p>	55

	ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKDFYWDSFDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NRYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKARGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK		RFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
TRGB162	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYATISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGNANYAQKFGG RVFITADESTSTAYMELSSLR EDTAVYYCARHVKRGLVNYWG QGLVTVSSASTKGPSVFPPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSYTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKARGQPREPQVYTL LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK	54	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	55

Пример 7. Оценка антител к G1TR в функциональном анализе уничтожения клеток.

Антитела, которые связываются с G1TR человека и яванского макака тестировали на активность в анализе ADCC и CDC. Для сравнения в таких анализах использовали изотипическое контрольное антитело huIgG1. Анализы ADCC использовали для изучения уничтожения клеток, которое осуществляли клетки NK-92, генетически модифицированные для экспрессирования высокоаффинного полиморфизма FcγRIIIa 176V/V. Использовали три вида клеток-мишеней: клетки HuT102, которые эндогенно экспрессируют G1TR человека, объединенные стабильные трансфектанты HT1080-huG1TR и клетки НЕК293, которые транзитивно трансфицировали G1TR человека или G1TR яванского макака. Для проведения анализов ADCC клетки-мишени помечали кальцеином AM, промывали, ресуспендировали в аналитической среде и высевали по 50000 клеток/50 мкл/лунка в 96-луночные планшеты с V-дном. В лунки с различной концентрацией добавляли анти-hG1TR или контрольные антитела (100 мкл/лунка). Эффекторные клетки NK-92 176V промывали, ресуспендировали в аналитической среде и высевали по 50000 клеток/50 мкл/лунка или 100000 клеток/50 мкл/лунка вместе с клетками-мишенями и антителами. В качестве контроля использовались чистая среда (фоновый сигнал), только клетки-мишени (сигнал спонтанного лизиса), клетки, которые в конечном счете будут обрабатываться Triton X-100 (сигнал макс. лизис), и изотипическое контрольное антитело в конечной концентрации 1 мкг/мл. После 1 ч инкубирования при 37°C индуцировали полный лизис клеток в лунках с макс. сигналом за счет добавления 20 мкл 2% Triton X-100, после чего планшеты центрифугировали. 100 мкл супернатантов отделяли и добавляли в черные планшеты с прозрачным дном. Единицы интенсивности флуоресценции (FI) измеряли с помощью Molecular Devices SpectraMax5. Процент специфического лизиса рассчитывали после вычитания средней FI, наблюдаемой для чистой среды из всех лунок. Для определения процента специфического лизиса использовали формулу (Образец - Спонтанный лизис)/(Макс.лизис - Спонтанный лизис)×100. Анализ полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) проводили для каждого антитела в Prism.

В табл. 5 представлена активность антител G1TR в различных тестируемых клеточных линиях.

Таблица 5. Активность антител GITR при анализе ADCC

	TRGB23 [^] EC ₅₀ (нг/мл)	TRGB25 [^] EC ₅₀ (нг/мл)	TRGB31 EC ₅₀ (нг/мл)	TRGB34 EC ₅₀ (нг/мл)	TRGB153 EC ₅₀ (нг/мл)	TRGB159 EC ₅₀ (нг/мл)	TRGB160 EC ₅₀ (нг/мл)
HuT102	От 1,6 до 1,9	От 6,8 до 9,4	От 2,9 до 3,7	От 1,3 до 1,7	От 0,6 до 1,8	От 32,7 до 61,1	От 11,2 до 21,3
HT1080- hGITR	От 0,9 до 4,5	От 15,0 до 67,4	От 2,0 до 4,2	От 2,4 до 9,8	От 0,01 до 1,2	6,7	От 4,2 до 26,6
HEK293- hGITR	4,4	52,0	7,6	5,8	1,9	2,9	30,2
HEK293- GITR яванского макака	10,2	465,9	Нет активности	Нет активности	2,5	25,8	56,7

[^]TRGB23 - это TRGB25, TRGB25 - это TRGB19.

Пример 8. Конструирование двойного гена и продукция молекул с низким содержанием фукозы.

В рамках подготовки к приготовлению линии клеток для TRGB25, TRGB153, TRGB159 и TRGB160 проводили конструирование двойного гена. В ходе данной процедуры было установлено, что тяжелая цепь TRGB25 относилась к аллотипу человека IgG1_G1m(17,1), а не к предпочтительному аллотипу человека IgG1_G1m(17). В ходе конструирования двойного гена V-область тяжелой цепи TRGB25 была трансформирована в структуру аллотипа человека IgG1_G1m(17), в результате был создан новый белок TRGB190. В этот момент также обнаружилась каркасная мутация TRGB160 в аминном конце тяжелой цепи. В ходе конструирования двойного гена концевой аминный остаток в тяжелой цепи TRGB160 был изменен с Q на E, тем самым, был образован новый белок TRGB191. Кроме того, было принято решение приготовить вариант TRGB191 с низким содержанием фукозы, то есть TRGB191.CLF. В табл. 6 приводятся последовательности таких модифицированных антител к GITR.

Таблица 6. Последовательности V_H и V_L для 2 кандидатов GITR mAb с модификацией каркасной области. CDR оставались без изменений и идентичны родительским

Идентификатор mAb	Аминокислотная последовательность V _H	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность V _L	SEQ ID NO:
TRGB190	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFGQ RVTITADESTSTAYMELSSLR EDTAVYYCARHRRFWDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC	63	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFI SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG	55
	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHPDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK		LSSPVTKSFNRGEC	
TRGB191. CLF	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGTFFSNYMWSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGTYADSVK RFTISRDNKNTLYLQMNLSRA EDTAVYYCAKDFYWDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPPLAP SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ YICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHCPPCPAPELGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QGNVVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	64	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFI SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	55

Пример 9. Измерение аффинности методом SPR.

Аффинности антител GITR к рекомбинантному GITR ECD человека измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием системы чипов для анализа белковых взаимодействий ProteOn XPR36 (BioRad).

Для каждого варианта измеряли скорости ассоциации и диссоциации с GITR ECD. Поверхность биосенсора подготовили методом ковалентного связывания козьих антител к IgG (Fc) человека с поверхностью чипа GLC (BioRad) согласно инструкциям производителя по проведению химической реакции связывания аминов. Иммуобилизовали 8800 OE (отвечающих единиц) козьих антител к IgG (Fc) человека (Jackson ImmunoResearch laboratories код товара 109-005-098). Иммуобилизованные OE также включали в себя козье антитело к мышинному Fc, которое было добавлено для захвата других антител, не включенных в число отмеченных в описании. Поскольку использовалась смесь 1:1, предполагается, что около 50% этих иммуобилизованных OE представляли собой козы антитела к Fc человека. Эксперименты с кинетикой связывания проводили при 25°C в подвижном буфере (PBS pH 7,4, 0,005% P20, 3 mM EDTA). В подвижном буфере готовили четырехкратные (1: 3) последовательные разбавления GITR ECD человека или GITR ECD яванского макака, начиная с 100 нМ. В среднем, на каждый канал сенсорного чипа было захвачено 300 OE mAb (174-600). В качестве эталонной поверхности использовали эталонные пятна (поверхность, модифицированную козьими антителами к IgG человека (Fc)), не содержащие захваченного потенциального антитела. После захвата mAb проводили 3-минутную инъекцию (фаза ассоциации) раствора антигена в концентрации 40 мкл/мин, затем - 10-минутную инъекцию проточного буфера (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали путем инъекции 0,85% фосфорной кислоты со скоростью 100 мкл/мин. Данные обрабатывали на программном обеспечении прибора. Проводили двойное эталонное вычитание данных, вычитая графики, полученные при инъекции буфера, из эталонных графиков, полученных при инъекциях анализируемых веществ. Кинетический анализ данных проводили, используя лэнгмюровскую модель связывания 1:1 с аппроксимацией групп. Результат для каждого mAb представлен в формате кон или скорости ассоциации, koff или скорости диссоциации и K_D (равновесная константа диссоциации) (табл. 7).

Таблица 7. Результаты аффинности по ППР для связывания анти-GITR mAb с белком GITR ECD человека и яванского макака

mAb	GITR	СРЕДН. k_{on} (1/Мс)	СРЕДН. k_{off} (1/с)	K _D (нМ)
TRGB25	Человек	7,93E+05	4,31E-05	54,3
	Яванский макак	2,37E+05	9,31E-04	3936
TRGB160	Человек	1,40E+05	1,50E-04	1077
	Яванский макак	8,80E+04	4,19E-05	476
TRGB153	Человек	9,96E+05	2,02E-05	20,2
	Яванский макак	2,99E+05	2,57E-03	8597
TRGB159	Человек	5,32E+05	1,62E-03	3045
	Яванский макак	1,85E+05	1,97E-03	10629
Отрицательный контроль	Человек/ Яванский макака		Нет связывания в тестируемых условиях	

Результаты свидетельствовали о том, что несколько антител соответствовали цели связывания с GITR ECD яванского макака с аффинностью в пределах пятикратной по сравнению со связыванием с GITR ECD человека. Очевидно, что полученные результаты противоречат данным по уничтожению клеток, обсуждавшимся в примере 7, где большинство антител уничтожали клетки, экспрессирующие GITR яванского макака, с эффективностью лишь незначительно меньшей, чем против клеток, экспрессирующих белок GITR человека. Существует вероятность неправильного сворачивания усеченных внеклеточных доменов GITR, которые сверхэкспрессируются в клетках насекомых, что приводит к расхождению между экспериментами по уничтожению клеток и анализам аффинности. Также, по всей видимости, вероятен правильное сворачивание для GITR полной длины, экспрессируемого в клетках человека, а потому результаты измерений аффинности связывания с экспрессирующими GITR клетками с большей вероятностью будут соответствовать наблюдаемой активности при уничтожении клеток. Для проверки перечисленных возможностей следует провести оценку аффинности этих антител к клеткам, которые экспрессируют GITR человека или яванского макака.

Пример 10. Измерение аффинности методом MSD.

Эксперименты по аффинности к клеткам проводили для оценки связывания антител к GITR с использованием линий клеток НЕК293, трансфицированных GITR человека и яванского макака, с помощью технологии измерения клеточной аффинности на основе MSD (MSD-CAT). MSD-CAT был разработан как собственный метод без использования меток, предназначенный для определения аффинности на интактных клетках в формате, обеспечивающем высокую производительность. В качестве отрицательного контроля использовалась материнская линия клеток НЕК293 без какой-либо экспрессии GITR.

Для измерения аффинности взаимодействия с использованием данной методики готовили серию растворов с фиксированной концентрацией анти-GITR антитела (300, 60, 12, 2,4 пМ) и меняющейся концентрацией клеток, экспрессирующих GITR человека или яванского макака ($2,0 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^3$ клеток/мл), и уравнивали их вращением планшетов в течение 18 часов при 4°C. Упомянутые образцы готовили в среде DMEM GlutaMax (Invitrogen, код товара 10569-044) с 0,05% азида, 1% BSA, 3 мМ EDTA. После уравнивания планшеты центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин и в супернатанте регистрировали свободные анти-GITR mAb. Свободные анти-GITR mAb в смеси регистрировали электролюминесценцией (ECL) с использованием устройства для считывания MSD. В целях регистрации планшеты MSD-стрептавидин (MesoScale Discovery, код товара L11SA-1) покрывали 0,1 мкг/мл биотинилированного антигена к GITR человека в аналитическом буфере в количестве 50 мкл/лунка и уравнивали в течение ночи (~16 ч при 4°C). После уравнивания планшеты блокировали добавлением 150 мкл/лунка аналитического буфера без удаления покрывающего антигена, инкубировали в течение ~1 ч при комнатной температуре и трижды промывали промывным буфером. Супернатанты из центрифугированных планшетов переносили в покрытые антигеном планшеты (50 мкл/лунка), инкубировали в течение 60 мин, а затем трижды промывали промывочным буфером. Затем добавляли 50 мкл/лунка 0,7 мкг/мл рутениевого конъюгата F(ab')₂ ослиного антитела к IgG человека (H+L) (Jackson ImmunoResearch; код товара 709-006-149) и инкубировали в течение 1 ч. Через 1 ч планшеты трижды промывали промывным буфером и в каждую лунку добавляли 150 мкл буфера считывания MSD (MesoScale Discovery номер по каталогу R92TC-1; приготовленного разбавлением исходного в соотношении 1: 3 в деион. H₂O). После этого планшеты сразу же сканировали на сканере MSD Sector Imager 6000, определяя уровни люминесценции. Сигнал ECL, определенный сканером MSD, выражали в % свободного антитела в смеси, и данные анализировали для определения аффинности с применением пользовательского уравнения (выведенного на основании закона действующих масс), введенного в программное обеспечение Prism. Концентрацию свободного mAb в зависимости от концентрации рецептора анализировали нелинейным методом наименьших квадратов в рамках модели связывания 1:1, чтобы определить аффинности связывания. В табл. 8 приводятся значения аффинности связывания с клетками для всех тестируемых молекул. Таблица 8. Результаты MSD-CAT для оценки аффинности анти-GITR mAb к клеточным линиям HEK293, экспрессирующим GITR человека и яванского макака

Проба	Исследования	GITR человека (K _d , пМ)	GITR яванского макака (K _d , пМ)	K _d , кратность разницы (Макак/Человек)
TRGB190	2	41 ± 22	63 ± 40* (91 ± 97)	1,5
	3	17 ± 4	27 ± 8	1,6
TRGB25	1	29,2	194	6,6
	2	26 ± 11	47 ± Н/О	1,8
	3	19 ± 4	45 ± 29	2,4
	4	23 ± 1	29 ± 7	1,3
TRGB191.CLF	2	287 ± 182	424 ± 155	1,5
	3	83 ± 18	262 ± 159	3,2
	4	158 ± 86	321 ± 63	2,0
TRGB160	1	112	711	6,3
	2	273 ± 192	464 ± 244* (598 ± 481)	1,7
	3	83 ± 43	210 ± 78	2,5
TRGB153	1	~10**	115	11,4

Значения аффинности для экспрессированных на клеточной поверхности GITR измеряли методом MSD-CAT для TRGB25, TRGB190, TRGB160, TRGB191.CLF и TRGB153. Проводили четыре исследования, при этом результаты первого исследования рассматривались как предварительные данные и включали только одно измерение. Проводились последующие исследования с большим числом повторных измерений (исследования 2 и 3). Результаты исследований 2 и 3 показывают, что в случае TRGB190 аффинность mAb к GITR яванского макака в 1,5-1,6 раза ниже, чем к GITR человека. Результаты исследований 2 и 3 также показывают, что в случае TRGB191.CLF аффинность mAb к GITR яванского макака в 1,5-3,2 раза ниже, чем к GITR человека. Исследование 4 проводили в более позднее время, чтобы подтвердить данные для TRGB191.CLF, полученные в предшествующих исследованиях. Результаты исследования 4 показывают, что в случае TRGB191.CLF аффинность mAb к GITR яванского макака в 2,0 раза ниже, чем к GITR человека.

Пример 11. Сигнал GITR через NF-κB и влияние блокады GITRL на передачу сигнала.

Для стимулирования адаптивного иммунитета необходимо размножение и сохранение антиген-примированных Т-лимфоцитов. Необходимые для роста и выживания сигналы в значительной мере поступают через канал NF-κB в активированных Т-клетках. Гамма-интерферон (IFN γ), хорошо известный ген-мишень фактора транскрипции NF-κB, является важнейшим цитокином для иммунитета к чужеродным патогенам, и продуцируется эффекторными Т-клетками Th1 CD4 и CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) после формирования антиген-специфического иммунитета (Schoenborn JR, Wilson CB. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101).

Члены суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), в которое входит и GITR, могут быть источником костимулирующего сигнала для Т-клеток. Он инициируется связыванием со своими соответствующими лигандами и посредством рекрутирования адапторных белков, известных как TRAF (фактор, ассоциированный с TNF-рецептором), которые могут передавать сигнал по пути NF-κB. Кроме того, интенсивность костимулированной передачи сигнала зависит от олигомеризации рецептора, которая может достигаться в присутствии тримерных или гексамерных растворимых лигандов или за счет опосредованного антителом перекрестного связывания.

Для регистрации эффекта воздействия лигирования анти-GITR антитела на активность NF-κB использовали модифицированный вариант системы HEK-Blue NF-κB (Invivogen). Такие клетки экспрессируют репортерный ген SEAP (секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы) при контроле минимального промотора, слитого с пятью NF-κB и сайтами связывания AP-1. Они были стабильно трансфицированы для экспрессии GITR человека. Перекрестное связывание рецептора GITR в данной системе определяет активность NF-κB, которая может обнаруживаться по секреции SEAP в супернатанте. В качестве положительного контроля использовали тримерный растворимый химерный белок лиганд GITR (R&D Systems).

Для "агонистического" тестирования 25 000 клеток HEK-Blue-NF-κB-GITR обрабатывали последовательно разбавленными 1: 2 порциями растворимого GITRL (начиная с 100 нг/мл) или анти-GITR антитела (начиная с 1 мкг/мл) в присутствии 5-кратного избытка антитела перекрестного связывания (анти-НА или анти-Fc, соответственно) в течение 16-20 ч. Супернатант (40 мкл) отделяли и смешивали с 160 мкл реагента Quanti-Blue™. Колориметрическую реакцию инкубировали при 37°C до 1 ч, прежде чем анализировать на спектрофотометре при OD-650 нм.

Для тестирования антител в "антагонистическом" режиме клетки обрабатывали последовательно разбавленными 1: 2 порциями анти-GITR антитела (начиная с 2 мкг/мл) в присутствии 25 нг/мл постоянной концентрации растворимого GITRL. К антагонистам относили антитела, которые блокировали связывание и активность в отношении NF-κB для растворимого GITRL более чем на 50%. Ниже приводятся репрезентативные графики, которые служат в качестве примеров вариабельности экспериментов.

В агонистическом режиме анти-GITR антитела были в состоянии перекрестного связывания GITR на клетках HEK-Blue-NF-κB-GITR, приводя к зависимому от дозы росту активности NF-κB по сравнению с изотипическим контрольным антителом, CNTO3930 (фиг. 3). В присутствии sGITRL отмечалось, что некоторые анти-GITR антитела снижают уровень sGITR-зависимой активации NF-κB, тогда как другие антитела не проявляют подобного эффекта, даже если вводятся в 400-кратной концентрации. Установлено, что TRGB191.CLF, GTRB45 и GTRB49 не блокируют взаимодействие GITRL:GITR более чем на 30%, что может быть связано с вариабельностью анализа. GTRB45 и GTRB49 относятся к неохарактеризованным антителам, которые также связываются с GITR.

Пример 12. Антитела против GITR могут усиливать ответ Т-клеток памяти на антиген CMV и ТТ.

Отличительной чертой иммунитета является генерация Т-клеток памяти против чужеродных антигенов, так что в случае повторного воздействия иммунный ответ будет формироваться намного быстрее.

Цитомегаловирус (CMV) относится к герпесвирусам и является распространенной инфекцией, которая обычно протекает без симптомов у здоровых взрослых и детей. По имеющимся оценкам 50-80% взрослых инфицированы CMV на момент достижения 40-летнего возраста. Столбнячный токсин (ТТ) вырабатывается бактериями *Clostridium tetani*. Большинство взрослых в США вакцинируются против столбняка 5 раз до достижения 6-летнего возраста и каждые 10 лет после этого проходят ревакцинацию.

При воздействии соответствующих антигенов на сероположительных индивидов можно реактивировать Т-клетки памяти для формирования вторичного иммунного ответа. Было продемонстрировано повышение уровня экспрессии GITR на Т-клетках и экспрессии GITRL на антиген-презентирующих клетках. Агонистическое GITR антитело может усиливать активацию Т-клеток посредством передачи сигнала через GITR, тем самым дополнительно усиливая антиген-специфический иммунный ответ.

Гамма-интерферон (IFN γ) является важнейшим цитокином для иммунитета к чужеродным патогенам и продуцируется эффекторными Т-клетками Th1 CD4 и CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) после формирования антиген-специфического иммунитета (Schoenborn JR, Wilson CB. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101).

В данном примере мы разработали метод анализа вторичного ответа для CMV и ТТ, чтобы охарактеризовать наши анти-GITR антитела с точки зрения их способности усиливать активацию Т-клеток, ко-

тору оценивали по секреции IFN γ . Коротко говоря, 150 000 PBMC, полученных от сероположительных доноров к CMV и ТТ, инкубировали в присутствии 0,1 мкг/мл антигена CMV или антигена ТТ (полный антиген CMV, Astarte № 1004; антиген ТТ, Astarte № 10 02) в лунках с предварительным покрытием рядом последовательных разбавлений 1: 2 тестируемых антител, начиная с 5 мкг/мл до 156 нг/мл (слева направо по оси x). Супернатант собирали через 4-6 дней, а уровни IFN γ количественно определяли с помощью MSD. Контроль, содержащий только антигены, использовали для оценки реактивности донора, и CNTO3930 вводилось в качестве антитела изотипического контроля. Для каждой концентрации антитела анализ повторяли несколько раз (n=6).

TRGB191.CLF усиливает CMV-зависимую активацию Т-клеток памяти дозозависимым образом, как было показано по результатам измерения секреции IFN γ , максимум которой наблюдался при [Ab]=5 мкг/мл (фиг. 4А). При анализе вторичного ответа для ТТ пик коактивации Т-клеток наблюдался при [Ab]=625 нг/мл (фиг. 4В).

Пример 13. Моноиммунотерапия с использованием анти-GITR индуцирует устойчивый противоопухолевый иммунитет.

Эффективность анти-GITR в формировании противоопухолевого иммунитета может исследоваться только на моделях опухоли, в которых хозяин обладает интактной иммунной системой. По этой причине мышиное суррогатное GITR антитело, DTA-1, исследовали в апробированных сингенных моделях карциномы толстой кишки, CT26 и MC38, на мышах Balb/C или C57/BL6, соответственно.

Мышам имплантировали подкожно (п/к) в правый бок 5×10^5 опухолевых клеток CT26 или MC38. На день 7 после имплантации опухолевых клеток мышей рандомизировали в экспериментальные группы со средним размером опухоли примерно 85 мм^3 или 120 мм^3 , соответственно.

Мышам вводили DTA-1 (BioXcell #BE0063) или изотипический контроль крысиного IgG2b (клон LTF-2, BioXcell № BE0090) внутрибрюшинно в количестве 200 мкг/животное однократно каждые 3-4 дня до суммарных 3 доз в дни 7, 11 и 14 (n=10/группа). Размер опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю до завершения исследования. Объем опухоли рассчитывали по формуле: Объем опухоли (мм^3)=(д×ш²/2); где "д" представляет собой длину, а "ш" ширину опухоли при определении с помощью измерительного инструмента, и отслеживали каждую неделю в течение всего исследования. Процент ингибирования роста опухоли (% TGI) определяли как разницу между средними объемами опухоли в группе лечения и контрольной группе, рассчитывали как $TGI = [((TVc - TVt) / TVc) \times 100]$, где TVc представляет собой средний объем опухоли в данной контрольной группе, а TVt представляет собой средний объем опухоли в группе лечения. В соответствии с критериями NCI TGI \geq 60% считается биологически значимым.

В модели MC38 статистически значимое ингибирование роста опухоли достигалось при введении DTA-1 (80% TGI на день 21 по сравнению с изотипическим контролем, p<0,0001) с регрессией опухоли, которая отмечалась уже на день 14 после введения DTA-1, а на день 28 достигались полные ответы (CR) у 5/10 животных. CR представлялись устойчивыми, при этом никакого повторного роста не отмечалось за период вплоть до 35 дней после последней дозы лечения.

В модели CT26 статистически значимое ингибирование роста опухоли достигалось при введении DTA-1 по сравнению с получавшими изотип контрольными животными (>65% TGI на день 27, p<0,0001) с регрессией опухоли, которая отмечалась у половины группы (5/10 животных) уже на день 14, и с полными ответами (CR), наблюдавшимися на день 31 (фиг. 5). CR представлялись устойчивыми, при этом никакого повторного роста не отмечалось за период вплоть до 42 дней после последней дозы лечения.

Пример 14. Комбинированная терапия анти-GITR с антителами иммунологической контрольной точки и антителом агонистом Т-клеток повышает противоопухолевый иммунитет.

Сингенную модель карциномы толстой кишки MC38 использовали для оценки комбинированной терапии анти-GITR в сочетании с анти-PD-1, анти-CTLA-4 блокадой контрольной точки или анти-OX-40 антителом.

Мышам имплантировали подкожно (п/к) в правый бок 5×10^5 опухолевых клеток MC38. В дни 14-21 после имплантации опухолевых клеток мышей рандомизировали в экспериментальные группы со средним размером опухоли примерно 200 мм^3 . Мышам вводили суррогатное анти-GITR (DTA-1, BioXcell № BE0063), анти-PD-1 (RMP1-14, BioXcell № BE0146), анти-CTLA-4 (9D9, BioXcell № BP0164), анти-OX40 (OX-86, BioXcell № BE0031) или изотипический контроль крысиного IgG2b (LTF-2, BioXcell № BE0090) внутрибрюшинно в количестве 100 мкг/животное однократно каждые 4 дня до суммарных 3 доз в дни 1, 5 и 9 после рандомизации (n=10/группа). Размер опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю до завершения исследования. Объем опухоли рассчитывали по формуле: Объем опухоли (мм^3)=(д×ш²/2); где "д" представляет собой длину, а "ш" ширину опухоли при определении с помощью измерительного инструмента, и отслеживали каждую неделю в течение всего исследования. Процент ингибирования роста опухоли (% TGI) определяли как разницу между средними объемами опухоли в группе лечения и контрольной группе, рассчитывали как $TGI = [((TVc - TVt) / TVc) \times 100]$, где TVc представляет собой средний объем опухоли в данной контрольной группе, а TVt представляет собой средний объем опухоли в группе лечения. В соответствии с критериями NCI TGI \geq 60% считается биологически значимым.

Статистически значимое ингибирование роста опухоли достигалось при введении анти-GITR по сравнению с когортой изотипического контроля, даже если введение начинали, когда опухоли были больше, и дозирование уменьшали с 200 мкг/мышь до 100 мкг/мышь. В группе комбинации анти-GITR+анти-PD-1 регрессию опухолей наблюдали у 5/10 животных на день 26 после рандомизации (фиг. 6). В группе комбинации анти-GITR+анти-CTLA-4 регрессию опухолей наблюдали у 3/10 животных, и задержка прогрессирования опухолей отмечалась у 2/10 животных (фиг. 7). Наконец, комбинация анти-GITR (d1)+анти-OX40 (d5, d9) была эффективнее монотерапии анти-GITR (d1, d5, d9) и монотерапии анти-OX40 (d5, d9) (фиг. 8).

Пример 15. Комбинированная анти-GITR и анти-PD1 терапия с вакцинацией индуцирует устойчивую антиген-специфическую экспансию, функционирование и дифференцировку CD8⁺ Т-клеток у мышей без опухоли.

Исследовались механизмы, посредством которых комбинированная терапия, мишенью которой является GITR с блокадой PD-1, усиливает Ag-специфический ответ CD8⁺ Т-клеток в условиях вакцинации. Для изучения данной проблемы мышей без опухоли однократно иммунизировали пептидной вакциной OVA с иммунодоминантным CTL эпитопом OVA257-264 (в дальнейшем именуемой Vax) и вводили 200 мкг анти-GITR в дни 0, 3 и 6 и 200 мкг анти-PD-1 в дни 3, 6, 9 и 12. Комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 усиливала эффекторную функцию CD8⁺ по сравнению с контролем, что подтверждалось повышенными уровнями ответов селезеночного Ag-специфического IFN γ в ELISpot, ответов полифункциональных CD8⁺ Т-клеток и повышенными уровнями CD107a/IFN γ CD8⁺ Т-клеток, проявляющих цитолитическую активность (фиг. 9A, B и C, соответственно). Тройная терапия индуцировала значительно более высокую частоту полифункциональных эффекторных CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих одиночный IFN γ , двойной IFN γ /TNF α , и тройной IFN γ /TNF α /IL-2, по сравнению с другими схемами лечения и контрольными группами (фиг. 9B). По результатам прямого окрашивания тетрамером OVA267-264 H-2K^b-SIINFEKL Vax/анти-GITR/анти-PD-1 значительно повышала частоту ответов OVA-тетрамер-специфических CD8⁺ Т-клеток в периферической крови на день 7 и 14 (фиг. 9D и 9E), указывая на направленную миграцию специфических для мишени CD8⁺ Т-клеток. Высокие частоты эффекторных клеток, секретирующих воспалительные цитокины Th1, свидетельствует о том, что комбинация *in vivo* анти-GITR/анти-PD-1 может усиливать индуцированные вакциной ответы Ag-специфических CD8⁺ Т-клеток.

Определяли степень вызванного комбинированной терапией сдвига дифференцировки Ag-специфических CD8⁺ Т-клеток в сторону эффекторного фенотипа в отличие от фенотипа памяти по результатам поверхностной экспрессии CD44 и CD62L через 14 дней после примирования вакциной. Фенотипический профиль центральных клеток памяти (CM) обычно соответствует CD44⁺ и CD62L⁺, а профиль эффекторных клеток памяти (EM)-CD44⁺ и CD62L⁻. Наблюдалось значительное увеличение в популяции OVA-тетрамер-специфических EM и CM CD8⁺ Т-клеток у мышей, получавших тройную комбинированную терапию, по сравнению с другими группами (фиг. 9E). Кроме того, отмечалось, что преобладающая популяция KLRG1⁺CD8⁺ Т-клеток представляет собой оптимальную эффекторную субпопуляцию для защитного иммунитета (25-27) и, по-видимому, жизненно важную субпопуляцию, которая коррелирует с эффективностью со схемами противораковой иммунотерапии (23, 28-29). Поэтому в качестве аналога характеризовали фенотип популяции Ag-специфических CD8⁺ Т-клеток для экспрессии на клеточной поверхности клеток-киллеров члена 1 (KLRG1) подсемейства лектиноподобных рецепторов G. Как показано на фиг. 9F, процентные доли тетрамер-специфических KLRG1⁺ эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти были значительно выше в группе тройной комбинированной терапии по сравнению с контрольными группами. Представленные результаты в совокупности демонстрируют, что комбинация анти-GITR/анти-PD-1 с вакцинацией может усиливать экспансию и функцию активных Ag-специфических CD8⁺ Т-клеток памяти *in vivo*.

Пример 16. Комбинированная терапия с вакцинацией индуцирует регрессию опухоли и повышает выживаемость у мышей с опухолями.

После подтверждения усиления ответа Ag-специфических эффекторных CD8⁺ Т-клеток, индуцированного тройной комбинированной терапией при в условиях отсутствия опухоли, возникает вопрос, может ли такая комбинация индуцировать противоопухолевый ответ в рамках слабо иммуногенной модели меланомы B16-OVA. Клетки опухоли B16-OVA имплантировали когортами интактных реципиентов мышей B6 (n=10/группа). Через несколько дней после имплантации, после того как опухоли достигали среднего размера ~30-40 мм³, мышей рандомизировали и проводили лечение, как описано на фиг. 10A. При схеме введения антител без вакцины, рост опухоли умеренно замедлялся, но не приводил к исчезновению опухоли, по-видимому, по причине слабой индукции Ag-специфических Т-клеток. Аналогичным образом, ни монотерапия Vax, ни комбинация с анти-GITR или анти-PD-1 mAb не обеспечивали выживаемость более 10-20%. Вместе с тем опухоли у мышей, получавших Vax/анти-GITR/анти-PD-1 росли значительно медленнее, чем во всех остальных группах (фиг. 10B-10C). Интересно отметить, что комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 значительно увеличивала регрессию опухоли и выживаемость у примерно 50% мышей по сравнению с другими вариантами комбинированной терапии или мо-

нотерапией вакциной (фиг. 10C-10D). Приведенные данные в совокупности показывают, что комбинация направленного действия анти-GITR антитела и блокады анти-PD-1 антитела может обеспечивать синергический эффект в сочетании с использованием вакцины для повышения общей выживаемости.

Пример 17. Комбинированная иммунотерапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 индуцирует Ag-специфические полифункциональные CD8⁺ Т-клетки и уменьшает популяцию Treg в опухолях.

Для понимания механизма действия комбинированной терапии анализировали Ag-специфический фенотип и функциональный ответ CD8⁺ эффекторных и CD4⁺ Treg, выделенных из опухолей после различных вариантов иммунотерапии. С учетом важной роли иммунитета полифункциональных эффекторных CD8⁺ Т-клеток в противоопухолевом иммунитете (Villarreal DO, et al. *Cancer Res* 2014;74:1789-800; Slaney CY, et al. *Cancer Res* 2014;74:7168-7174), популяцию Ag-специфических CD8⁺ Т-клеток и ее экспрессию IFN γ и TNF α в ответ на *ex vivo* стимулирование пептидом OVA257-264 SIINFEKL изучали через 15 дней после имплантации опухоли (фиг. 11A). Комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 значительно увеличивала продукцию IFN γ и TNF α из эффекторных CD8⁺ Т-клеток в опухолях по сравнению со всеми другими группами (фиг. 11A). Более того, терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 демонстрировала синергический эффект, что подтверждается более высокой частотой OVA-специфических IFN γ /TNF α двойных положительных CD8⁺ Т-клеток в пределах опухоли (фиг. 11A). Поскольку цитолитические CD8⁺ CTL являются важнейшими компонентами защиты от опухолей (Villarreal DO, et al. *Cancer Res* 2014;74:1789-800; Slaney CY, et al. *Cancer Res* 2014;74:7168-7174), с помощью маркера экспрессии CD107a определяли цитолитический потенциал клеток, подвергающихся дегрануляции. Результаты показывают, что инфильтрирующие опухоль лимфоциты CD8⁺ (TIL), выделенные из мышей с опухолью, получавших Vax/анти-GITR/анти-PD-1, отличались значительно более высокой частотой CD8⁺ Т-клеток с литической активностью по отношению к OVA257-264 по сравнению с контролем, а значит, такие Т-клетки обладали более высоким потенциалом направленного воздействия на опухолевые клетки (фиг. 11B). Тройная комбинация также индуцировала более высокую частоту OVA-тетрамер-специфических CD8⁺ Т-клеток, направленно мигрирующих в опухоль (фиг. 11C). Более того, аналогичная тенденция отмечалась и для частоты CD8⁺ Т-клеток, секретирующих IFN γ , TNF α и/или экспрессирующих CD107a при стимулировании PMA/ION, что свидетельствует о том, что комбинация Vax/анти-GITR/анти-PD-1 индуцировала в целом больше функциональных ответов CD8⁺ Т-клеток (фиг. 11D). Получавшие Vax/анти-GITR/анти-PD-1 TIL, стимулированные PMA/ION, отличались более высокой частотой цитолитических CD8⁺ Т-клеток, коэкспрессирующих CD107a⁺IFN γ ⁺. Это коррелирует с существенным увеличением цитолитической активности со значительным контролем роста и/или регрессией развившихся опухолей у мышей.

Поскольку один из механизмов действия анти-GITR mAb приводит к снижению уровня CD4⁺ Treg в опухолях (Cohen AD, et al. *PloS one* 2010;5:e10436; Schaer DA, et al. *Curr Opin Immunol* 2012;24:217-224; Schaer DA, et al. *Immunother Cancer* 2014;15:2-7), оценивали эффекты комбинированной иммунотерапии Vax/анти-GITR/анти-PD-1 на такие клетки в опухолях. При этом до оценки популяции Treg в опухолях проводили мониторинг популяции Treg в селезенке на день 14 у мышей без опухоли с использованием схемы на фиг. 10, но для интактных мышей. Наблюдалось значительное снижение Treg в получавшей Vax/анти-GITR/анти-PD-1 группе по сравнению с другими группами иммунотерапии (фиг. 12A). Таким образом, на основании приведенных результатов предполагалось, что тройная комбинированная терапия будет приводить к снижению уровня Treg в опухолях. Мониторинг популяции на день 15 после имплантации опухоли показал, что оба варианта иммунотерапии анти-GITR/анти-PD-1 и Vax/анти-GITR/анти-PD-1 аналогичным образом и резко снижали инфильтрацию Treg в опухоли (фиг. 12C-12D), свидетельствуя о том, что комбинация анти-GITR в обоих вариантах может снижать число инфильтрирующих опухоль Treg. Тройная комбинация в целом демонстрировала более эффективное снижение Treg в опухолях по сравнению со всеми получавшими лечение группами. Общее снижение популяции Treg в большинстве вакцинированных групп, возможно, было связано с благоприятным ответом Th1 в TME, переводя TME из супрессивного в воспалительный (Tatsumi T, et al. *J Exp Med* 2002;196:619-628; Fridman WH, et al. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298-306). Все варианты иммунотерапии, кроме анти-GITR/анти-PD1, значительно увеличивали инфильтрацию CD8⁺ Т-клеток в опухоли (фиг. 12B), что, вероятно, вызвано индуцированием Ag-специфических ответов CTL, вызванных пептидной вакциной, как показано на фиг. 9 и фиг. 11A. В результате, резко увеличились соотношения CD8/Treg внутри опухоли, при этом тройная комбинированная терапия была статистически более эффективной по сравнению с любой другой комбинированной терапией Ab (фиг. 12D), ответ, который был описан как коррелирующий по терапевтической эффективности в рамках модели меланомы (Quezada SA, et al. *J Clin Invest* 2006;116:1935-1945). В совокупности, синергические эффекты комбинации Vax/анти-GITR/анти-PD-1, усиливающие ответы реагирующих на опухоль CTL, снижающие число Treg и приводящие к увеличению соотношений эффекторных Т-клеток к Treg в опухолях, могут формировать более Ag-специфическую воспалительную микро среду, которая в большей степени способна опосредовать удаление опухоли.

Пример 18. Комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 индуцировала отторжение опухоли B16-OVA, опосредованное CD8⁺ Т-клетками, и формировала более долгосрочную память.

Инфильтрирующие опухоль CD8⁺ Т-клетки демонстрировали синергическое усиление на фоне иммунизации пептидом в комбинированной терапии Vax/анти-GITR/анти-PD-1, указывая на то, что повышенное индуцирование ответов активных CTL с наибольшей вероятностью имело важнейшее значение для эффективности комбинированной терапии. По этой причине исследовали влияние популяций эффекторных клеток на отторжение опухоли, вызванное комбинированной терапией. Как показано на фиг. 13А, при проведении терапии у мышей с опухолью отмечалось истощение CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и NK клеток. Результаты показывают, что истощение CD8 полностью разрушало благоприятные эффекты, обеспечиваемые Vax/анти-GITR/анти-PD-1, поскольку ни одна из мышей не выжила через 22 дня после имплантации (фиг. 13В). Напротив, истощение клеток CD4 и NK не влияло на противоопухолевую активность терапии Vax/анти-GITR/анти-PD-1 (фиг. 13В), свидетельствуя о том, что перечисленные клетки не играли никакой роли в наблюдаемой эффективности. В целом, не отмечалось никаких статистических различий в опухолях у контрольных мышей или у получавших только анти-CD8 или только анти-NK1.1. В соответствии с ранее проведенным исследованием (Fujiwara S, et al. *J Invest Dermatol* 2014;134:1884-92) мы наблюдали задержку роста опухоли и значительное различие в наблюдаемой выживаемости ($p=0,0037$; CD4-истощенные по сравнению с изотипом) с группой, получавшей только анти-CD4 (фиг. 13В). Вместе с тем не отмечалось никаких дополнительных преимуществ введения aCD4 (фиг. 13В) или aCD25 (фиг. 16) при комбинированной терапии Vax/анти-GITR/анти-PD-1, указывая на то, что комбинация может действовать независимо от хелперных Т-клеток или истощения регуляторных CD4⁺ Т-клеток. В целом, результаты показывают, что CD8⁺ Т-клетки являются основной эффекторной популяцией, ответственной за выживание и вызывающей отторжение опухоли.

Конечной целью вакцинации и активной иммунотерапии против злокачественного новообразования является генерация Т-клеток с долгосрочной памятью, которые могут быстро реагировать на последующее воздействие Ag. Для оценки ответов памяти проводили эксперименты по повторной провокации выживших животных без опухоли через 6 месяцев после завершения лечения. Все мыши, которые выжили после первой провокации опухоли с лечением Vax/анти-GITR/анти-PD-1, выжили после второй провокации опухоли для той же опухоли через 6 месяцев (фиг. 13С), указывая на продолжительный противоопухолевый иммунитет и индуцирование ответов долгосрочной памяти. Кроме того, если мышей, выздоровевших после лечения Vax/анти-GITR/анти-PD-1, вновь провоцировали материнской опухолевой линией B16.F10, которая не экспрессировала OVA, у ~80% мышей не отмечалось опухоли, которая отторгалась при повторной провокации (фиг. 13D). В целом, приведенные данные показывают, что комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 может индуцировать ответы долгосрочной памяти, а также распространение эпитопа против других антигенов, экспрессированных опухолевыми клетками.

Пример 19. комбинация Vax/анти-GITR/анти-PD-1 индуцирует активные Ag-специфические инфильтрирующие опухоль KLRG1⁺ эффекторные CD8⁺ Т-клетки, имеющие важное значения для контроля и удаления опухоли.

Углубленные исследования в данной области показали, что CTL играют главную роль в отторжении опухоли, и число инфильтрирующих опухоль эффекторных CD8⁺ Т-клеток часто коррелирует с благоприятным прогнозом (Blohm, U., et al. *Eur. J. Immunol.* 2006;36: 468-477; Boissonnas, A. et al. *J. Exp. Med.* 2007;204:345-356; Steer, H. J., et al. *Oncogene* 2010;29:6301-6313). В последнее время в ряде исследований высказывалась поддержка гипотезы о том, что субпопуляция KLRG1⁺ эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти может предсказывать терапевтическую эффективность против патогенов и опухолей (Villarreal DO, et al. *Molecular Therapy* 2015;10:1653-1662; Olson JA, et al. *Immunity* 2013;38:1250-60; Cush SS, Flano E. *J Immunol* 2011;186:4051-8; Ye F, et al. *J Immunol* 2012; 189:5206-11; van Duikeren S, et al. *J Immunol* 2012;189:3397-403; Villarreal DO, et al. *Cancer Res* 2014;74:1789-800; Slaney CY, et al. *Cancer Res* 2014;74:7168-7174; Brunner SM, et al. *Hepatology* 2015;61:1957-67). Увеличение числа KLRG1⁺CD8⁺ Т-клеток в периферической крови мышей без опухоли на фиг. 9F показывает, что такие клетки могут быть иммунным коррелятом для полной регрессии опухоли, индуцированной тройной комбинированной терапией (фиг. 10). Таким образом, проводилось исследование возможной связи регрессии опухоли со способностью такой терапии вызывать устойчивые ответы инфильтрирующих опухоль KLRG1⁺ эффекторных Ag-специфических CD8⁺ Т-клеток памяти. Через двенадцать дней после имплантации опухоли (через 5 дней после начала терапии; фиг. 10А) отмечалось, что комбинированная терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 приводит к наибольшему увеличению ответов тетрамер-специфических CD8⁺ Т-клеток в опухолях (фиг. 14А). Затем проводили оценку субпопуляции эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти по маркеру экспрессии KLRG1. Интересно отметить, что терапия Vax/анти-GITR/анти-PD-1 приводила к ~2-кратному увеличению частоты инфильтрирующих опухоль KLRG1⁺CD8⁺ эффекторных клеток и клеток KLRG1⁺CD8⁺Tet⁺ по сравнению со всеми другими группами (фиг. 14В-14С), указывая на то, что Ag-специфические KLRG1⁺CD8⁺ эффекторные клетки могут направляться в область опухоли для активации быстрой эффекторной функции. В целом, мы показали, что генерация большего числа KLRG1⁺CD8⁺ эффекторных Т-клеток коррелировала с регрессией развившихся опухолей, наблюдавшейся в ходе комбинированной терапии Vax/анти-GITR/анти-PD-1.

Если экспансия субпопуляции KLRG1⁺CD8⁺ является одним из механизмов, который способствовал обеспечению более эффективного контроля/регрессии опухоли в комбинированной терапии Vax/анти-

G1TR/анти-PD-1, было важно определить, будет ли истощение субпопуляции KLRG1⁺CD8⁺CD44⁺ эффекторных Т-клеток приводить к потере контроля над ростом опухоли. Во-первых, определяли способность анти-KLRG1 (аKLRG1) антитела приводить к истощению целевой популяции. Для проведения такого анализа две группы мышей без опухоли вакцинировали в рамках комбинированной терапии Vax/анти-G1TR/анти-PD-1, и одной группе вводили 200 мкг анти-KLRG1 mAb (200 мкг) в день 0, 2, 4 и 6 после вакцинации, а в день 7 после начала лечения контролировали экспрессию KLRG1 на CD8⁺ Т-клетках из крови и селезенки (фиг. 17). Отмечалось, что анти-KLRG1 mAb снижало процент CD8⁺ Т-клеток (фиг. 17А) и сокращало целевую популяцию KLRG1⁺CD8⁺CD44⁺ (фиг. 17В-17С). Получавшие Vax/анти-G1TR/анти-PD-1 анти-KLRG1 мыши демонстрировали значительное снижение частоты и/или абсолютной суммарной численности популяций KLRG1⁺CD8⁺CD44⁺ и KLRG1⁺CD8⁺Tet⁺ в крови и селезенке по сравнению с не получавшей KLRG1 контрольной группой (фиг. 17В-17С). Затем оценивали вклад популяции KLRG1⁺CD8⁺CD44⁺ в стимулирование отторжения опухоли, индуцированного тройной комбинированной терапией, посредством истощения клеток KLRG1⁺CD8⁺CD44⁺ у мышей с опухолями. Результаты показывают, что истощение KLRG1 значительно снижало уровень защиты, поскольку мыши с пониженным уровнем KLRG1 Ab демонстрировали более быстрый рост опухоли, чем получавшие комбинационную терапию без снижения уровня KLRG1 (фиг. 14D). Более удивительным было то, что комбинированная терапия со снижением αKLRG1 не приводила к регрессии развитой опухоли и долгосрочной выживаемости без введения аKLRG1 (0% по сравнению с 40% отторжения опухоли). Полученные результаты в совокупности показывают, что увеличение числа Ag-специфических KLRG1⁺ эффекторных CD8⁺ Т-клеток, индуцированное тройной комбинированной терапией, было механизмом, посредством которого такая динамика способствовала контролю роста опухоли, ее регрессии и долгосрочной выживаемости в такой терапевтической модели меланомы. Таким образом, экспансия такой субпопуляции эффекторных CD8⁺ Т-клеток может быть главным преимуществом для будущих стратегий иммунотерапии.

Пример 20. Комбинированная терапия анти-G1TR/анти-PD-1 демонстрирует синергический эффект с аутоантигенной связанной с опухолью антигенной вакциной для повышения противоопухолевой эффективности.

Главной проблемой для разработки эффективных схем противораковой иммунотерапии является генерация активных противоопухолевых ответов против слабо иммуногенных связанных с опухолью антигенов (ТАА), например, аутоантигенов. Приведенные на фиг. 13D результаты показывают, что комбинированная терапия Vax/анти-G1TR/анти-PD-1, вероятно, индуцировала распространение эпитопа на другие ТАА меланомы вне OVA. Таким образом, в результате возникал вопрос о том, может ли комбинированная терапия анти-G1TR/анти-PD-1 усиливать эффективность вакцины, кодирующей связанный с опухолью аутоантиген. Связанный с тирозиназой антиген опухоли меланомы белок-2 (TRP-2) выбирали потому, что он является одним из наиболее подробно изученных слабых иммуногенных антигенов опухоли меланомы. Было показано, что однократная моновакцинация TRP2 оказывает мощное противоопухолевое воздействие при проведении профилактики у мышей с меланомой B16 (Avogadri F, et al. Cancer Immunol Res 2014;2:448-458; Pedersen SR, et al. J Immunol 2013;191:3955-3967). Вместе с тем такая активность контроля опухоли существенно снижается и ограничивается при проведении терапии. Аналогичным образом, монотерапия анти-G1TR/анти-PD-1 антителом отличалась ограниченной эффективностью (фиг. 10). Поэтому для 8-дневных опухолей (со средним диаметром опухоли ~50 мм³) проводили жесткую терапию с использованием комбинированной терапии анти-G1TR/анти-PD-1 с одновременной трехкратной иммунизацией мышей пептидной вакциной TRP2, как показано на фиг. 15А.

Комбинированное лечение развившихся опухолей демонстрировало значительное подавление роста опухоли по сравнению с контрольными группами (фиг. 15В), указывая на то, что такое лечение в состоянии нарушить толерантность к аутоантигену. Еще более важно то, что комбинированная терапия 3× TRP2/анти-G1TR6/анти-PD-1 приводила к полной и устойчивой регрессии у ~20% мышей, тогда как монотерапия не вызывала полной регрессии (фиг. 15В). Данное наблюдение еще раз подтверждает, что анти-G1TR/анти-PD-1 может проявлять синергический эффект в присутствии вакцин, усиливая противоопухолевый иммунитет. В целом, проведенные исследования подтверждают представление о том, что комбинация анти-G1TR/анти-PD-1 может использоваться в качестве иммунотерапии для усиления индуцированных вакциной ответов против аутоантигенов опухоли и антигенов, не относящихся к таким антигенам.

Пример 21. Введение анти-CD122 демонстрирует синергический эффект в присутствии вакцины опухоли и анти-G1TR МАВ для достижения оптимальной терапевтической эффективности.

Несмотря на то что монотерапия анти-CD122 задерживала прогрессирование опухоли, она не приводила к излечению при более жестком терапевтическом вмешательстве для 7-дневных опухолей (со средним диаметром опухоли ~30 мм³) в тестированных условиях (фиг. 18А-В). Поэтому, с тем чтобы повысить интенсивность специфического по отношению к опухоли иммунного ответа, пептидную противораковую вакцину против антигена новообразованных опухолей OVA (SIINFEKL) использовали в комбинации с терапией анти-CD122. Терапевтическое вмешательство при 7-дневных развившихся опу-

хотя с использованием анти-CD122 и разовой дозы пептидной вакцины демонстрировало значительное подавление роста опухоли, приводящее к ~10% долгосрочной выживаемости, тогда как монотерапия любым одним из агентов приводила лишь к незначительному эффекту или к его отсутствию (фиг. 18A-B). Анализ TIL показал, что в случае комбинирования анти-CD122 с вакциной отмечалось значительное снижение частоты G-MDSC по сравнению с монотерапией каждым агентом (фиг. 19A-D). Кроме того, комбинированная терапия также значительно увеличивала продукцию двойного $IFN\gamma/TNF\alpha$ из эффекторных $CD8^+$ TIL и синергически повышала уровень OVA-тетрамер-специфических $CD44^+CD8^+$ Т-клеток памяти в опухолях (фиг. 19A-D). Увеличение уровня OVA-тетрамер-специфических $CD8^+$ Т-клеток также отмечалось на периферии у мышей без опухоли, получавших комбинированную терапию вакциной и анти-CD122 (фиг. 20A-C). Комбинированная терапия заметно снижала долю $CD4^+$ Treg по сравнению с монотерапией каждым агентом (фиг. 19D), указывая на то, что повышение общего уровня защиты, наблюдаемого в группе комбинированной терапии, было связано с (1) усилением ответа Ag-специфических $CD8^+$ Т-клеток, (2) снижением G-MDSC, и (3) сокращением популяции $CD4^+$ Treg в опухоли. Такие изменения могут формировать более благоприятные условия для отторжения опухоли.

Стратегию примирования-стимулирования в рамках вакцинации применяли на день 7, 10 и 14 для лечения 7-дневных развитых опухолей и демонстрировали более долгосрочную выживаемость (30%) по сравнению с разовой дозой вакцины в таких условиях проведения терапии (фиг. 21A). Поскольку в литературе приводились сведения о том, что $CD8+CD122+$ Т-клетки обладают свойствами $CD8^+$ Т-клеток памяти (Li S et al., *Cell Mol Immunol* 2014; 11:326-31; Liu J et al., *Front Immunol* 2015;6:494), мы исследовали, может ли выбор такой популяции в качестве мишени повлиять на генерацию Т-клеток с продолжительной памятью. Вторая провокация опухолью выживших после примирования-стимулирования на день 80 после лечения не приводила к росту опухоли, указывая на формирование и сохранение определенных уровней Т-клеток памяти в ходе комбинированной терапии (фиг. 21B).

Наконец, в свете повышенной эффективности за счет дополнительных преимуществ снижения уровней Treg в исследованиях комбинированных схем Vax/анти-CD122 и анти-CD4/анти-CD122 исследовали возможность использования только анти-CD122 для достижения синергического эффекта с анти-GITR mAb иммунотерапии, которая в состоянии снизить число $CD4^+$ Treg в опухоли (Schaer DA et al., *Curr Opin Immunol* 2012;24:217-224).

Терапевтическое вмешательство для 4-дневных опухолей с использованием комбинированной терапии mAb против анти-CD122 и анти-GITR демонстрировало синергические эффекты со значительным подавлением роста опухоли, что приводило к ~40% долгосрочной выживаемости по сравнению с монотерапией анти-CD122 (фиг. 22A-22B). Проведенные исследования открыли дополнительные возможности для разработки нацеленных на GITR подходов в комбинации с дополнительными схемами противоопухолевой иммунотерапии.

Пример 22. Картирование эпитопа, связывающегося с TRGB191.

Для идентификации эпитопов связывания TRGB191 на внеклеточном домене GITR человека проводили масс-спектрометрическое исследование изотопного водород-дейтериевого обмена в растворе (HDX-MS).

Расщепление пепсином/протеазой XIII и ЖХ-МС.

Для расщепления пепсином/протеазой XIII 3,2 мкг GITR человека в 133 мкл контрольного буфера (50 mM фосфата, 100 mM хлорида натрия при pH 7,4) денатурировали добавлением 135 мкл 4 M гуанидингидрохлорида, 0,85 M буфера TCEP (конечный pH 2,5) с инкубированием смеси в течение 3 мин при 25°C. Затем проводили расщепление смеси пепсином/протеазой XIII на колонке и полученные пептиды анализировали с помощью системы СВЭЖХ-МС, включающей ВЭЖХ Waters Acquity, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Пептиды разделяли на колонке 50 мм×1 мм C8 с 19 мин градиентом от 2-28% растворителя B (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле) для образцов, содержащих GITR человека. Растворитель A - 0,2% муравьиной кислоты в воде. Клапан инжектора и колонка пепсина/протеазы XIII и их соответствующие соединительные трубки располагаются внутри охлаждаемого корпуса, где поддерживается температура 11°C. И второй переключающий клапан, колонка C8, и их соответствующие соединительные трубки из нержавеющей стали находятся внутри другого охлаждаемого корпуса с циркуляцией, где поддерживается температура 0°C. Выявление пептида осуществляют путем поиска данных MS/MS в сравнении с последовательностью GITR человека с помощью Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составляет 10 ч./млн и 0,05 Да соответственно.

Определение массы гликана.

10 мкг GITR человека дегликозилировали инкубированием с 1 мкл PNGase F при 37°C в течение ночи. Образец затем высушивали и повторно растворяли гликан, после чего инкубировали с 5 мкл 400 mM прокаинамида (готовили в соотношении 3: 7 уксусная кислота: DMSO (об./об.) и 1 M цианборгидрид натрия) при 65°C в течение 3 ч. Чтобы удалить избыток реагентов для введения метки, образец повторно растворяли в 90% ACN до общего объема раствора 500 мкл. После кондиционирования планшета HILIC-SPE 200 мкл воды и 200 мкл 90% ACN, образец загружали на планшеты HILIC-SPE, промывали 200 мкл

90% ACN и элюировали 50 мкл 20% ACN. До проведения последующего анализа добавляли 75 мкл ACN. Массы гликана измеряли с помощью СВЭЖХ-МС, в состав которой входили СВЭЖХ ACQUITY и Bruker MicroTOF QII.

HDX.

Смесь 8 мкл GITR человека (3,2 мкг) или 8 мкл GITR человека и mAb (3,2 мкг: 2 4 мкг) инкубировали с 125 мкл приготовленного на дейтерированной воде буфера введения (50 мМ фосфата натрия, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4) в течение 0, 60, 300, 1800, 7200 и 14400 с при 25°C. Обмен водород-дейтерий останавливали добавлением 135 мкл 4 М гуанидингидрохлорида, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH 2,5). Затем образцы после остановки обмена наносили на колонку расщепления с пепсином/протеазой XIII и анализировали с помощью ЖХ-МС, как описано выше. Масс-спектры регистрировали только в режиме MS.

Исходные данные MS обрабатывают с помощью программного обеспечения HDX WorkBench, предназначенного для анализа данных MS обмена H/D (J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521). Уровни дейтерия вычисляют с помощью средней разности масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t_0).

Результаты.

Уровни дейтерия в выявленных пептидах отслеживали по сдвигу масс на ЖХ-МС. Нативный GITR-ECD человека демонстрировал значительное снижение уровня дейтерирования при связывании с mAb TRGB191.CLF по остаткам 28-50 и 70-79 в SEQ ID NO:62. Поэтому, такие области со значительным снижением уровня дейтерирования при связывании с mAb были отнесены к пептидам эпитопа, которые выделены темно- или светло-серым на фиг. 23.

Моделирование эпитопа в структуре GITR.

HDX-МС эксперименты по связыванию mAb TRGB191 с GITR ECD человека указывают на прерывистость эпитопа, который локализован в пределах двух пептидных областей в GITR:

область 1 (остатки 28-50 в SEQ ID NO:62),

область 2 (остатки 70-79 в SEQ ID NO:62).

Структура эпитопа связывания mAb TRGB191 дополнительно уточнялась посредством картирования данных HDX в рамках трехмерной модели GITR, полученной на основе кристаллической структуры GITR ECD в комплексе с TRGB159 Fab. Согласно приведенной структуре, значительная часть двух пептидов недоступна для растворителя. Доступные фрагменты пептидов соседствуют в пространстве и включают остатки 40-45 и 75-79 в SEQ ID NO:62 (выделены на фиг. 24).

Структуру определяли следующим образом.

Комплекс GITR:TRGB159 готовили смешением Fab с 25% молярным избытком GITR ECD в 20 мМ Tris, pH 8,5, 250 мМ NaCl и инкубировали при 4°C в течение ночи. Образование комплекса контролировали на колонке Superdex 200. Кристаллизацию комплекса проводили методом диффузии паров в сидячей капле при 20°C. Пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы получали из 14% PEG 3350 и 0,2 М формиата Na в буфере 0,1 М HEPES, pH 7,5. Для сбора данных рентгена один кристалл замачивали на несколько секунд в маточном растворе, содержащем раствор криопротектора, с добавлением 24% глицерина и мгновенно охлаждали в жидком азоте. Данные рентгеновской дифракции получали на Advanced Photon Source (Argonne, IL) с использованием детектора Mar225. Интенсивности дифракции регистрировали с разрешением 2,8 Ангстрема и обрабатывали с помощью программы XDS (Kabsch, W. (2010). XDS. Acta Cryst. D66, 125-132.). Структуру устанавливали методом молекулярного замещения с помощью программы Phaser (McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. & Read, R.J. (2007). J. Appl. Кристалличность 40, 658-674), опираясь на структуру 5116 из базы данных Protein Data Bank в качестве поисковой модели. При размещении Fab внутри элементарной ячейки молекулу GITR вводили вручную, исходя из электронной плотности, с использованием программы Coot (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. (2010). Acta Cryst. D66, 486-501).

Пример 23. Активность ADCC для TRGB191.CLF на первичных активированных Т-клетках и клеточной линии JLN-3.

Полиморфизм в гене FcγRIIIA (rs396991) приводит к изменению замещения аминокислот с валина на фенилаланин в положении 158 (V158F), при этом аллотип 158V проявляет более высокую аффинность к IgG1 человека и повышенную ADCC; такой полиморфизм иногда обозначался в литературе как V176F (Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. J Clin Invest; 1997; 100 (5): 1059-70). В работе Cartron et al. было получено подтверждение того, что гомозиготный генотип FcγRIIIA-158V является единственным параметром, связанным с положительным клиническим ответом на ритуксимаб, которая представляет собой антитело, механизм действия которого включает ADCC опухолевых клеток (Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Blood; 2002; 99(3):754-8).

TRGB191.CLF готовили как антитело с низким уровнем фукозилирования, и вследствие этого оно отличается примерно в 10 раз более высокой аффинностью к FcγRIIIA, рецептору Fc, который присутствует на клетках NK, по сравнению с "обычным" фукозилированным вариантом (RFV) того же mAb (K_D

была ~37 нМ по сравнению с ~370 нМ в варианте с высокой аффинностью FcγRIIIA-158V, и ~180 нМ по сравнению с 1750 нМ в варианте с низкой аффинностью FcγRIIIA-158F, соответственно).

Было показано, что антитела с повышенной аффинностью к FcγRIIIA проявляют более высокую активность ADCC (Strohl W, Strohl L. Therapeutic Antibody Engineering - Current and Future Advances Driving the Strongest Growth Area in the Pharmaceutical Industry. 1st ed. Sawston: Woodhead Publishing; 2012). Активность ADCC для TRGB191.CLF оценивали по отношению к нескольким клеткам-мишеням или линиям клеток, экспрессирующим различные уровни hGITR. Например, периферические Т-клетки в состоянии покоя экспрессируют минимальные уровни GITR, но экспрессия GITR на этих клетках увеличивается при их активации *in vitro*. Линия клеток JN-3 представляет собой линию лейкозных клеток плазмы человека, которая экспрессирует эндогенный hGITR при более физиологических уровнях по сравнению с клетками HuT102, и в большей степени близко к наблюдаемым на активированных Т-клетках или на дифференцированных *in vitro* T_{reg}.

Активность ADCC для TRGB191.CLF характеризовали для широкого диапазона отношений клеток Е: Т на первичных Т-клетках в состоянии покоя или на активированных Т-клетках (см. фиг. 25) и на клетках JN-3 (см. фиг. 26) с использованием эффекторных клеток NK-92 158V/V.

TRGB191.CLF проявлял минимальную активность ADCC на находящихся в состоянии покоя неактивированных CD4⁺ Т-клетках (см. фиг. 25А, левая панель) и неактивированных CD8⁺ Т-клетках (см. фиг. 25В, левая панель). На активированных первичных Т-клетках, экспрессирующих GITR, JNJ-64164711 вызывал высокую активность ADCC со значениями EC₅₀ в диапазоне от 11 нг/мл до 32 нг/мл при наиболее высоком соотношении Е: Т, составляющим 5: 1; значения менялись в зависимости от отношений Е: Т (см. табл. 9). Величина V_{max} также зависела от соотношения клеток Е: Т и увеличивалась по мере увеличения доли эффекторных клеток, присутствующих в системе. Антитело изотипического контроля (CNT03930) не индуцировало ADCC.

Ранее было показано, что клетки JN-3 экспрессируют более низкие уровни GITR, чем клетки HuT102, и в диапазоне, который более сопоставим с активированными первичными Т-клетками и генерированными *in vitro* T_{reg}, несмотря на то что уровни были в несколько раз выше. При тестировании клеток JN-3 с использованием высокоаффинных эффекторных клеток NK-92 158V в широком диапазоне соотношений Е: Т (см. фиг. 26), TRGB191.CLF индуцировал активность ADCC в диапазоне от 50 нг/мл до 130 нг/мл со значениями V_{max}, весьма близкими к полученным при анализе ADCC с активированными первичными Т-клетками (см. табл. 9). Изотипический контроль (CNT03930) не оказывал никакого воздействия.

Таблица 9. Сводные данные по JNJ-64164711-зависимой NK-92-опосредованной активности ADCC как функции соотношения Е:Т

	Первичные активированные CD4 ⁺ Т-клетки		Первичные активированные CD8 ⁺ Т-клетки		JN-3	
	EC ₅₀ (нг/мл)	V _{max}	EC ₅₀ (нг/мл)	V _{max}	EC ₅₀ (нг/мл)	V _{max}
	Е:Т (5:1)	11, 32	95, 48	32, 18	93, 84	53, 78
Е:Т (2:1)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	78, 92	87, 5
Е:Т (1:1)	20, 31	78, 02	49, 02	62, 71	83, 35	76, 05
Е:Т (1:2)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	105	58, 7
Е:Т (1:5)	29, 61	51, 11	47, 5	37, 97	126, 8	42, 84

Нет данных, условия не исследовали. Данные для изотипического контроля CNT03930 и неактивированных первичных клеток-мишеней не приводятся, поскольку было невозможно получить достоверную подгонку кривой с помощью используемого программного обеспечения. Е: эффекторные клетки NK-92 158V/V; Т: клетки-мишени (CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки или клетки JN-3).

Пример 24. Активность ADCC для TRGB191.CLF на дифференцированных *in vitro* TREG.

Недавно опубликованные и наши собственные данные свидетельствовали о том, что GITR экспрессируется на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, присутствующих в микроокружении опухоли у мышей и человека, при этом наиболее высокий уровень экспрессии наблюдался на CD4⁺ T_{reg} в солидных опухолях.

Проводили дифференцировку и экспансию периферических CD4⁺ Т-клеток, чтобы трансформироваться в функционально супрессивные T_{reg}, которые определялись как CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Такие T_{reg} экспрессируют близкие уровни GITR по сравнению с активированными первичными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками. TRGB191.CLF индуцировали антителозависимое уничтожение T_{reg}-клеток сопоставимое с активностью, наблюдаемой в случае клеток JN-3 (см. фиг. 27). Изотипический контроль (CNT03930) не

оказывал никакого воздействия.

Пример 25. Активность ADCC TRGB191.CLF с использованием эффекторных клеток с высокой и низкой аффинностью полиморфизмов FcγRIIIA.

TRGB191.CLF обладает примерно в 10 раз повышенной аффинностью к FcγRIIIA-158V/V и FcγRIIIA-158F/F по сравнению с RFV того же mAb; его значение K_D к варианту FcγRIIIA-158F/F с низкой аффинностью равнялось ~180 нМ, что около в 2 раза больше аффинности RFV к варианту рецептора с высокой аффинностью (370 нМ).

Активность ADCC TRGB191.CLF в отношении клеток JLN-3 была сопоставимой с использованием эффекторных клеток NK-92, экспрессирующих либо вариант FcγRIIIA-158V/V с высокой аффинностью, либо вариант FcγRIIIA-158F/F с низкой аффинностью, при этом значение EC_{50} менялось ~2 раза (40,01 нг/мл и 87,44 нг/мл, соответственно) (см. фиг. 28).

Пример 26. Комбинация анти-GITR с анти-CD40, анти-OX40 или анти-PDL-1 приводит к более эффективной задержке роста опухоли.

У животных, получавших антитела изотипического контроля с меньшими исходными объемами опухоли (~100 мм³), медианное время до конечной точки (МТЕ) составляло примерно 19 дней. Дозирование DTA-1 в однократной дозе 10 мг/кг в день 1 приводило к 2 устойчивым полным регрессиям (CR) и задержке МТЕ до 29,3 дня. FGK4.5, анти-CD40, которое дозировали в количестве 2 мг/кг в дни 1, 5 и 9, приводило к 6 CR и заметной задержке МТЕ до 60 дней. Комбинация однократной инъекции 10 мг/кг DTA-1 на день 1 наряду с FGK4.5 (трижды однократно каждые 4 дня) приводила к 8 CR до дня 40, при этом на данный момент отмечалось 1 прогрессирование (фиг. 29).

У животных, получавших антитела изотипического контроля с большими исходными объемами опухоли (~230 мм³), медианное время до конечной точки (МТЕ) составляло примерно 10,5 дней. FGK4.5, которое дозировали в количестве 10 мг/кг в дни 1, 5 и 9, приводило к 1 полному ответу (CR) и заметной задержке МТЕ до 33 дней. Комбинация однократной инъекции 10 мг/кг DTA-1 на день 1 наряду с FGK4.5 (трижды однократно каждые 4 дня) приводила к 4 устойчивым CR (фиг. 30).

Совместное комбинирование DTA-1 (10 мг/кг, раз в день, день 1) и антител OX86 (анти-OX40, 10 мг/кг, трижды однократно каждые 4 дня, начиная с дня 1) также приводила к более эффективным ответам противодействия росту опухоли с увеличением с 2 CR с DTA-1 до 5 CR для комбинации DTA-1 с OX86. В варианте монотерапии OX86 не ингибировал прогрессирования опухоли (фиг. 31).

Совместное комбинирование DTA-1 (10 мг/кг, раз в день, день 1) и RMP1-14 (анти-PD-1, 10 мг/кг, трижды однократно каждые 4 дня) было также более эффективным, чем отсрочка одного из вариантов терапии с ее проведением через два дня после первого агента. Монотерапия анти-PD-1 приводила к 3 CR, монотерапия анти-GITR приводила к 2 CR и комбинированная терапия анти-GITR и анти-PD-1 при одновременном введении приводила к 8 CR. Такая эффективность снижалась до 4 или 5 CR, если доза анти-PD-1 или анти-GITR вводилась первой при последовательном применении, соответственно (фиг. 32).

Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	Белок	Человек	TFGB5 и TRGB20-HCDR1	GFTFSGYW
2	Белок	Человек	TFGB14-HCDR1	GFTFSSYA
3	PRT	Человек	TFGB23, TFGB25, TFGB120, TFGB127, TFGB134, TFGB144, TFGB153, TFGB159, TRGB162 и	GGTFSSYA

			TRGB190-HCDR1	
4	Белок	Человек	TRGB31, TRGB34 и TRGB35-HCDR1	GYSFTSYW
5	Белок	Человек	TRGB5, TRGB14, TRGB160, TRGB191, TRGB191. CLF- HCDR2	ISGSGGST
6	Белок	Человек	TRGB20-HCDR2	ISSDGGSK
7	Белок	Человек	TRGB23, TRGB25, TRGB120, TRGB134, TRGB144, TRGB153, TRGB159 и TRGB190-HCDR2	IIPIFGTA
8	Белок	Человек	TRGB31-HCDR2	IDPSDSDT
9	Белок	Человек	TRGB34-HCDR2	IYPGDSDT
10	Белок	Человек	TRGB35-HCDR2	IDPGDSDT
11	Белок	Человек	TRGB127. TRGB162-HCDR2	IIPIFGNA
12	Белок	Человек	TRGB5-HCDR3	AKDFYWDAFDY
13	Белок	Человек	TRGB14-HCDR3	AKPIRGLDY
14	Белок	Человек	TRGB20-HCDR3	AKEVVYDHYAALDY
15	Белок	Человек	TRGB23-HCDR3	ARHGNWLHFNLDY
16	Белок	Человек	TRGB25-HCDR3	ARHRRFWLDY
17	Белок	Человек	TRGB31-HCDR3	ARVFPYGLVLDY
18	Белок	Человек	TRGB34-HCDR3	ARDYGWHDFDY
19	Белок	Человек	TRGB35-HCDR3	ARHRWSTSLLLDY
20	Белок	Человек	TRGB120-HCDR3	ARPRRNTNELDY
21	Белок	Человек	TRGB127 и TRGB162-HCDR3	ARHVYKRGVLNY
22	Белок	Человек	TRGB134-HCDR3	ARHRWGSGNLDY
23	Белок	Человек	TRGB144-HCDR3	ARHGFRQGYLDY
24	Белок	Человек	TRGB153-HCDR3	ARHAWLGHLDY
25	Белок	Человек	TRGB159-HCDR3	ARHGRNSGRLDY
26	Белок	Человек	TRGB160, TRGB191, TRGB191. CLF-HCDR3	AKDFYWDSFDY
27	Белок	Человек	TRGB160, TRGB191 и TRGB191. CLF-HCDR1	GFTFSNYW
28	Белок	Человек	TRGB5, TRGB23, TRGB25, TRGB31, TRGB34, TRGB35, TRGB134, TRGB144, TRGB153, TRGB159, TRGB160, TRGB191, TRGB191.	QSVSSY

			CLF и TRGB162-LCDR1	
29	Белок	Человек	TRGB14-LCDR1	QSVNNF
30	Белок	Человек	TRGB20-LCDR1	QSVNSF
31	Белок	Человек	TRGB120 и TRGB127-LCDR1	QSISSY
32	Белок	Человек	TRGB5, TRGB14, TRGB23, TRGB25, TRGB31, TRGB34, TRGB35, TRGB134, TRGB144, TRGB153, TRGB159, TRGB160, TRGB191, TRGB191. CLF и TRGB162-LCDR2	DAS
33	Белок	Человек	TRGB20-LCDR2	YAS
34	Белок	Человек	TRGB120 и TRGB127-LCDR2	AAS
35	Белок	Человек	TRGB5, TRGB23, TRGB25, TRGB31, TRGB34, TRGB35, TRGB134, TRGB144, TRGB153, TRGB159, TRGB160, TRGB191, TRGB191. CLF и TRGB162-LCDR3	QQRSNWPLT
36	Белок	Человек	TRGB14-LCDR3	QQGFNAPLT
37	Белок	Человек	TRGB20-LCDR3	QQYIRWPLT
38	Белок	Человек	TRGB120 и TRGB127-LCDR3	QQSYSTPLT
39	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSGYWMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDFYWDAFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

				KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSGSEFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
40	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKPIRGLDYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSGSEFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
41	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB20	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSGYWMNWVRQAPGKLEWV SGISSDGGSKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKEVVYDHYAALDYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSGSEF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB23	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPITFGTANYAQKFKGRVITTA DESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC ARHGNWLFNLDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

				ESNGQPENNYKTTPPVLDSGSGFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
43	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB25	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC ARHRRFWLDYWGQGTTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGSGFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
44	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB31	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWM GIIDPSDSDTRYSPSFQGGVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARVFPYYGLVLDYWGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNKEYKCKVSNKALPAPIE KTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSGFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
45	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWM GIIYPGSDSDTRYSPSFQGGVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARDYGWHDYWGQGTTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGSGFFLY

				SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
46	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB35	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWM GIIDPGSDTRYSPSFQGVVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYIC ARHRWSTSLLDYWGQTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB120	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC ARPRRNTNELDYWGQTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
48	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB127	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGNANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC ARHVYKRGVNLNYWGQTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE

				ALHNHYTQKSLSLSPGK
49	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB134	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPITFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARHRWGSNLDYWGQGTLLVTVSSA STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
50	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB144	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPITFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARHGFQRGYLDYWGQGTLLVTVSSA STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
51	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB153	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPITFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARHAWLGHLDYWGQGTLLVTVSSAS TKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>

52	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB159	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARHGRNSGRLDYWGQGLVTVVSSA STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
53	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB160	<p>QVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAA SGGTFSSNYWMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDFYWDSFDYWGQGLVTVVSSAS TKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>
54	Белок	Человек	Тяжелая цепь TRGB162	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGNANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARHVYKRGVLYWGQGLVTVVSSA STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
55	Белок	Человек	TRGB5, TRGB23,	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR

			TRGB25, TRGB31, TRGB34, TRGB35, TRGB134, TRGB144, TRGB153, TRGB159, TRGB160, TRGB162, TRGB190, TRGB191 и легкая цепь TRGB191. CLF	ASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	Белок	Человек	Легкая цепь TRGB14	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVNNFLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSDFT LTISSLEPEDFAVYYCQGFNAPL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57	Белок	Человек	Легкая цепь TRGB20	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVNSFLAWYQQKPGQAPRLLI YYASNRATGIPARFSGSGSDFT LTISSLEPEDFAVYYCQYIRWPL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
58	Белок	Человек	TRGB120 и TRGB127- легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSDFT LTISSLQPEDFATYYCQSYSTPL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
59	Белок	Человек	STR 26-161	QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARC CRVHTTRCCRDYPGECCSEWDCM CVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPG QGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTF GGHEGHCKPWTDCQFGFLTVPFG NKTHNAVCPGSPPAE
60	Белок	Человек	GITR 26-241	QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARC CRVHTTRCCRDYPGECCSEWDCM CVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPG QGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTF GGHEGHCKPWTDCQFGFLTVPFG NKTHNAVCPGSPPAEPLGWLTVV LLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLR SQCMWPRETQLLEVPSTEDARS CQFPEEERGERSAEEKGRLGLWV
61	Белок	Яванский макак	GITR	QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARC CRVHTTRCCRDYQSECCSEWDCV

				CVQPEFHCGNFCCTTCQHHPCPSG QGVQPQKFSFGFRCVDCALGTF RGHDGHCKPWTDCQFGFLTVPFG NKTHNAVCPVPGSPPAEPPGWLTI VLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLG SQPTGPRETQLLLEVPSTEDASS CQFPEEERGERLAEKGRGLDLWV
62	Белок	Человек	GITR полной длины	MAQHGAMGAFRALCGLALLCALSL GQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDAR CCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDC MCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPP GQGVQSQKFSFGFQCIDCASGTF SGGHEGHCKPWTDCQFGFLTVPFG GNKTHNAVCPVPGSPPAEPLGWLTV VLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQL RSQCMWPRETQLLLEVPSTEDAR SCQFPEEERGERSAEEKGRGLDLW V
63	Белок	Человек	TRGB190-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFGQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC ARHRRFWLDYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
64	Белок	Человек	TRGB191 и TRGB191. CLF- VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYWMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDVAVYYC AKDFYWDSFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD DNLNKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYS SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
65	Белок	Человек	GITR-L	MTLHPSPIITCEFLFSTALISPKMC
				LSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKL WLFCSIVMLLELCSFSWLIIFLQ LETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASS EPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIY GQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKD MIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVG D TIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILL ANPQFIS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR человека и содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35.

2. Антитело по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64, спаренную с областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 55.

3. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело специфически связывается с GITR человека посредством взаимодействия с аминокислотными остатками GITR (SEQ ID NO: 62):

- a) 40-45 и
- b) 75-79.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое связывается с полипептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое специфически связывается с GITR человека с аффинностью связывания по меньшей мере 30 нМ, как показывают результаты измерений с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое индуцирует повышение экспрессии люциферазы в анализе гена люциферазы NF-κB.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое индуцирует ADCC in vitro со значением EC₅₀ менее чем около 67 нг/мл.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент является рекомбинантным.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет изотип IgG1.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с GITR человека или с GITR яванского макака.

14. Полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

15. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.14.

16. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.15.

17. Способ продукции антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающей молекулы из культуры.

18. Способ ослабления симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1 индивиду при необходимости такого введения в количестве, достаточном для ослабления симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния у индивида.

19. Способ по п.18, в котором индивид является человеком.

20. Способ по п.18, дополнительно включающий одно или более из следующего:

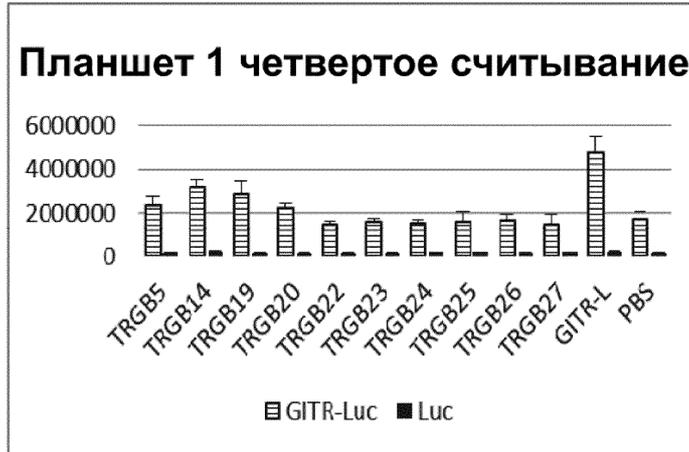
- a) проведение химиотерапии;
- b) проведение радиационной терапии или
- c) введение одного или более терапевтических агентов.

21. Способ по п.20, в котором дополнительным терапевтическим агентом является иммуностимулирующий агент.

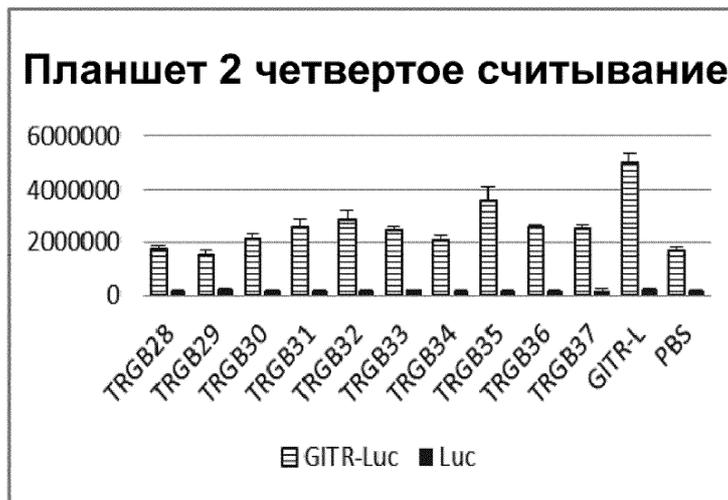
22. Способ по п.21, в котором иммуностимулирующий агент выбран из группы, состоящей из антитела к PD-1, антитела к CTLA-4, антитела к CD122, антитела к CD40, антитела к OX40 и CD8 Ag-специфической OVA пептидной вакцины.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

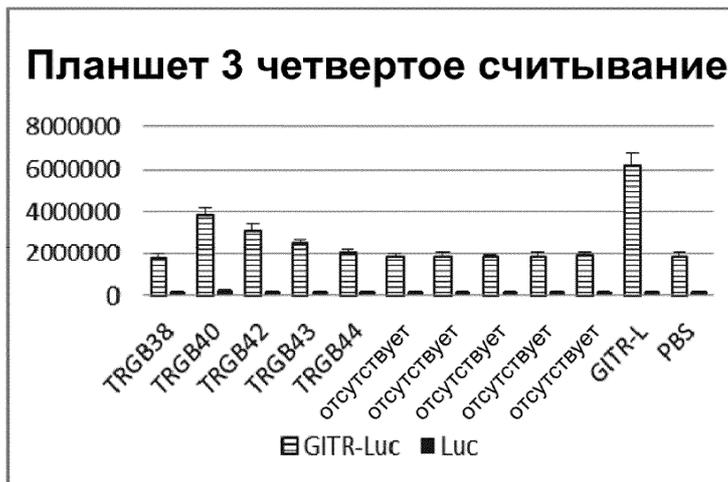
24. Набор для ослабления симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния, отличающийся тем, что содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 и упаковку для него.



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 1С



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 2D



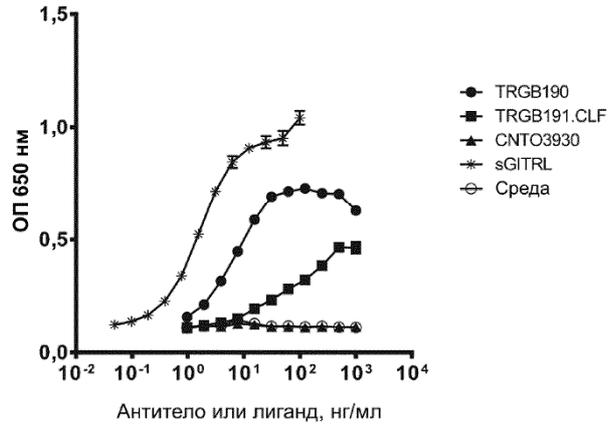
Фиг. 2E

Подпись к оси X

В#	pDR
TRGB153	pDR000021547
TRGB160	pDR000021516
TRGB123	pDR000021515
TRGB121	pDR000021496
TRGB144	pDR000021476
TRGB159	pDR000021469
TRGB134	pDR000021457
TRGB162	pDR000021448
TRGB127	pDR000021448
TRGB119	pDR000021434
TRGB124	pDR000021433

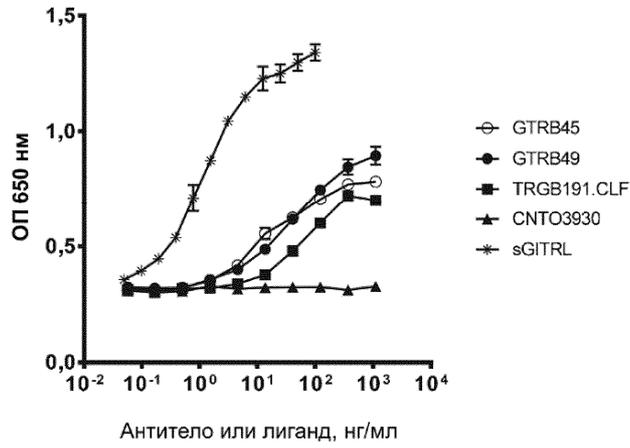
Фиг. 2F

СИГНАЛ NF-КарраВ



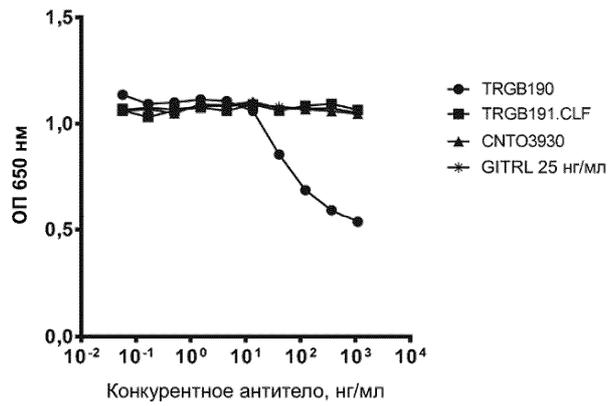
Фиг. 3А

СИГНАЛ NF-КарраВ



Фиг. 3В

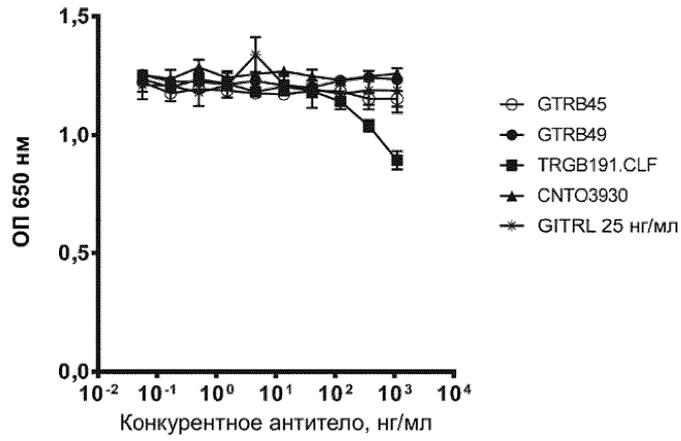
ЭФФЕКТ БЛОКАДЫ GITRL



ЛЕЧЕНИЕ
в присутствии GITRL

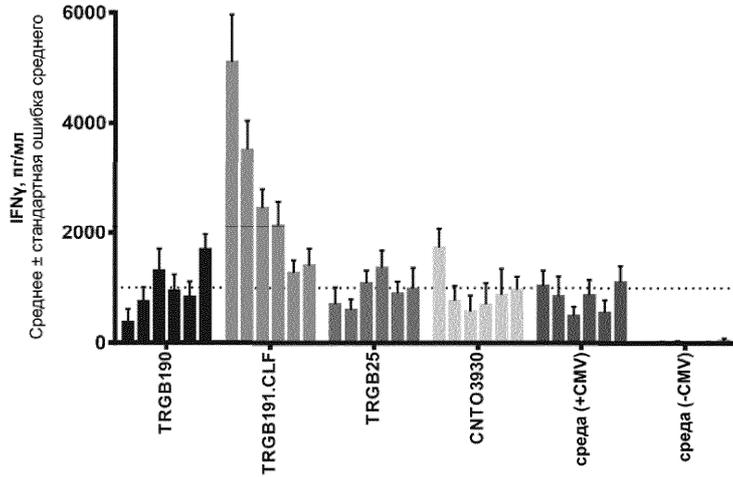
Фиг. 3С

ЭФФЕКТ БЛОКАДЫ GITRL



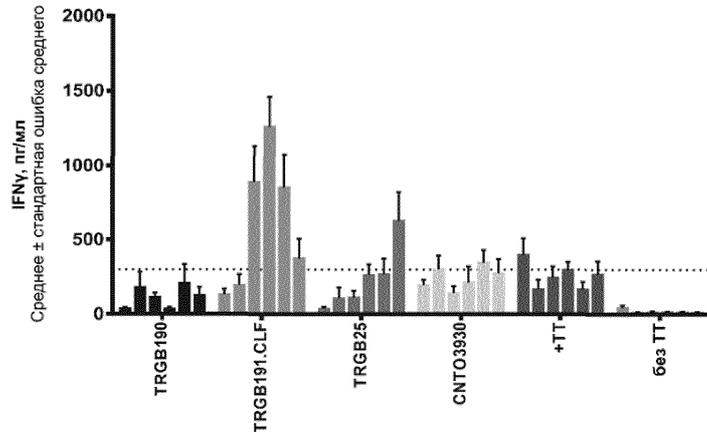
ЛЕЧЕНИЕ
в присутствии GITRL
Фиг. 3D

Анализ вторичного ответа на CMV



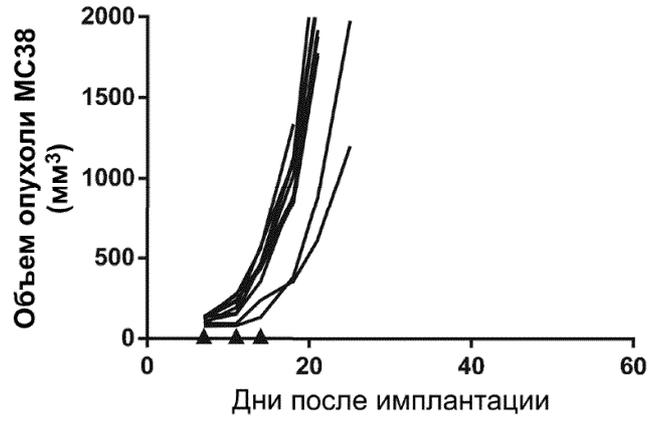
ЛЕЧЕНИЕ
Фиг. 4А

Анализ вторичного ответа на ТТ



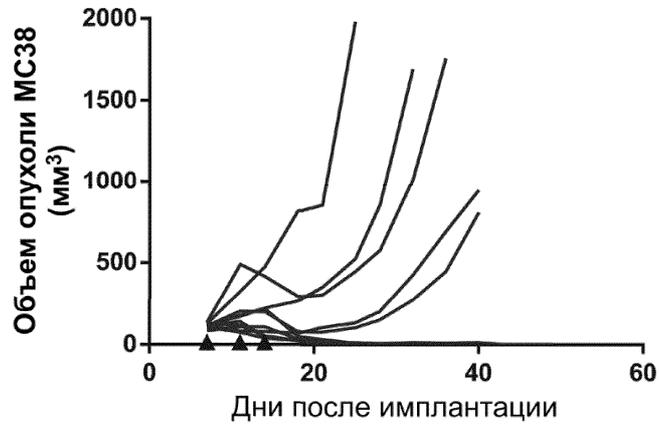
ЛЕЧЕНИЕ
Фиг. 4В

Изотипический контроль



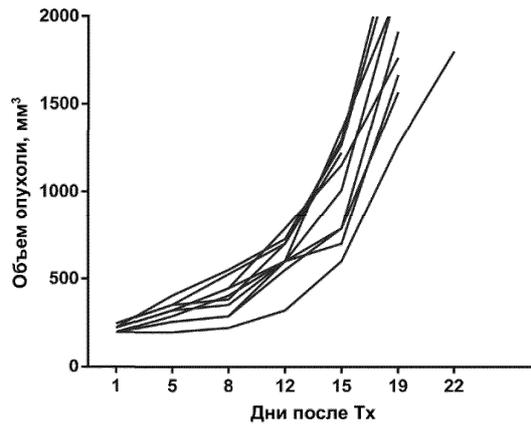
Фиг. 5А

DTA-1 (GITR)

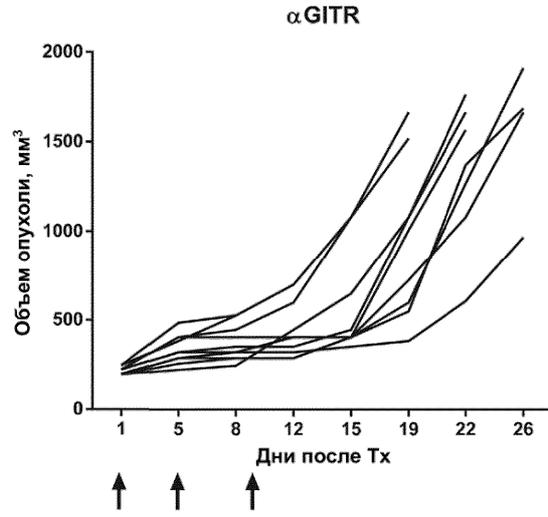


Фиг. 5В

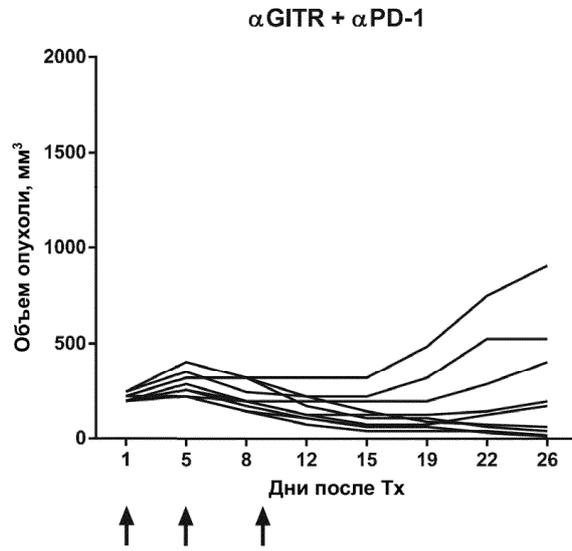
Изотипический контроль



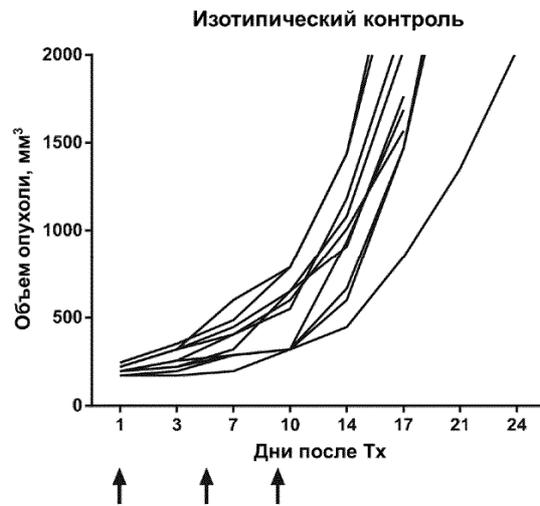
Фиг. 6А



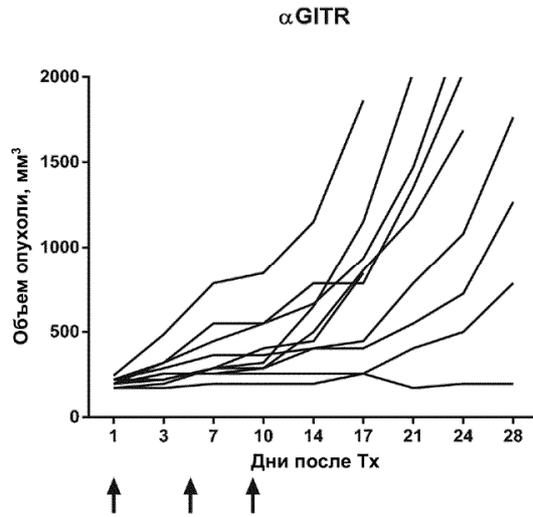
Фиг. 6В



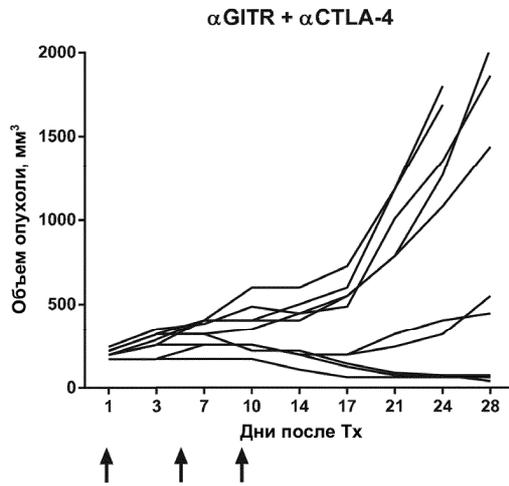
Фиг. 6С



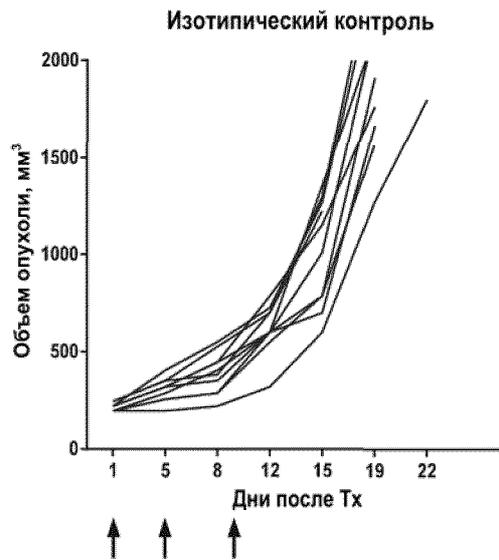
Фиг. 7А



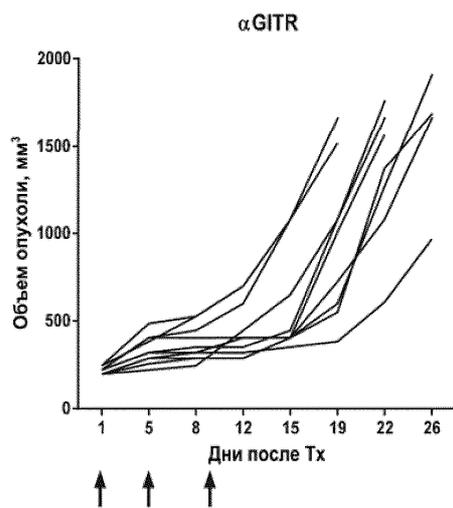
Фиг. 7B



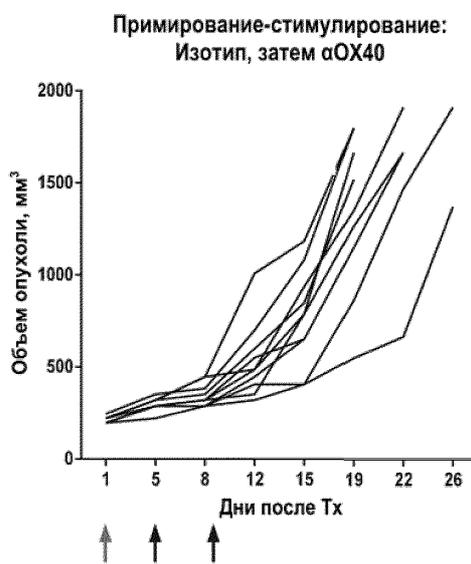
Фиг. 7C



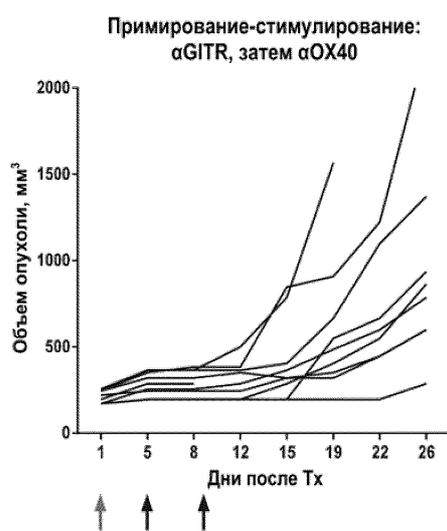
Фиг. 8A



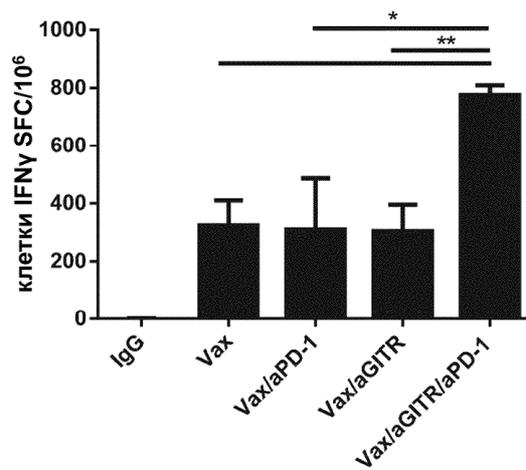
Фиг. 8В



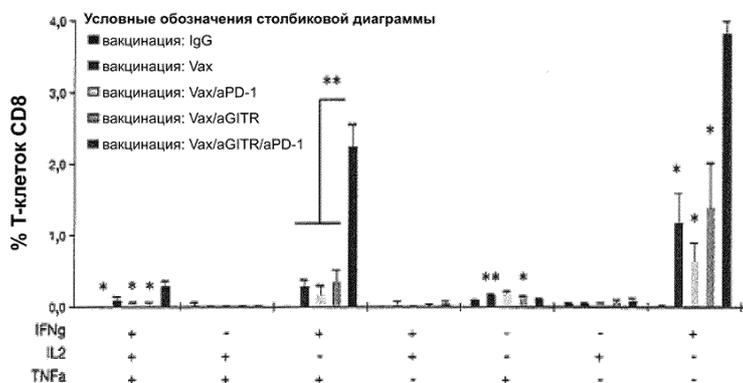
Фиг. 8С



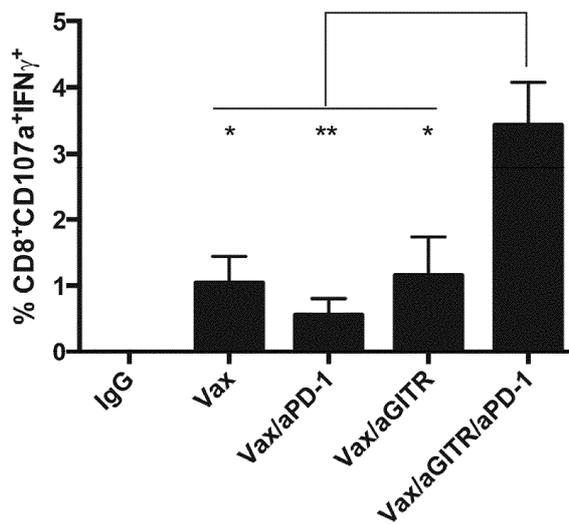
Фиг. 8D



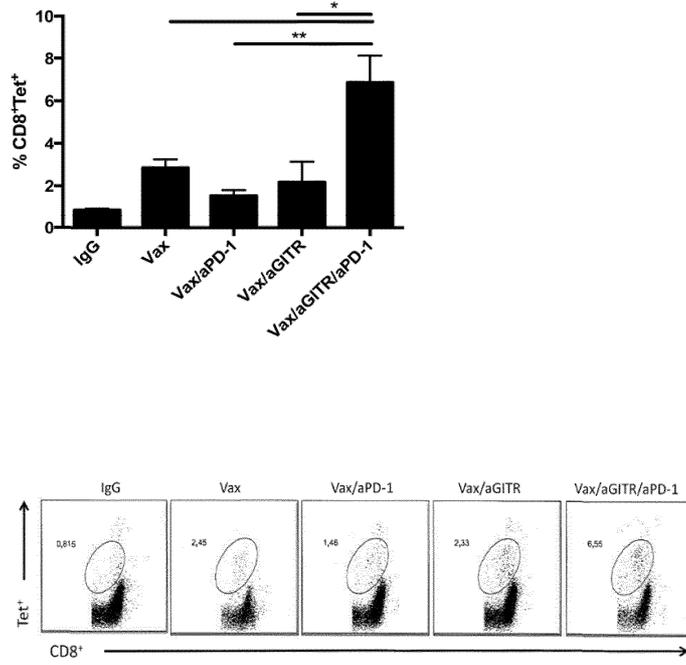
Фиг. 9А



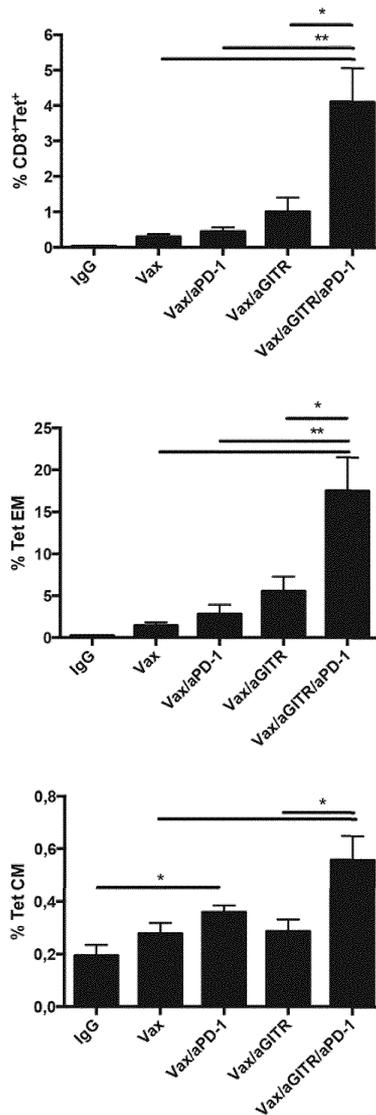
Фиг. 9В



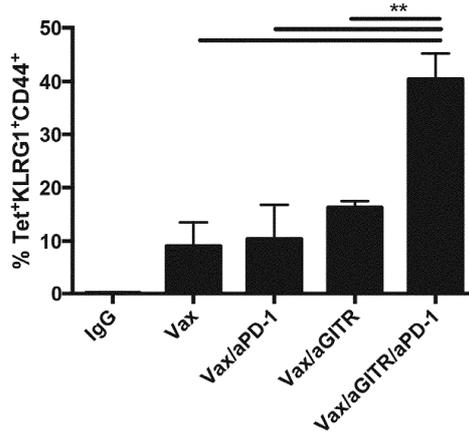
Фиг. 9С



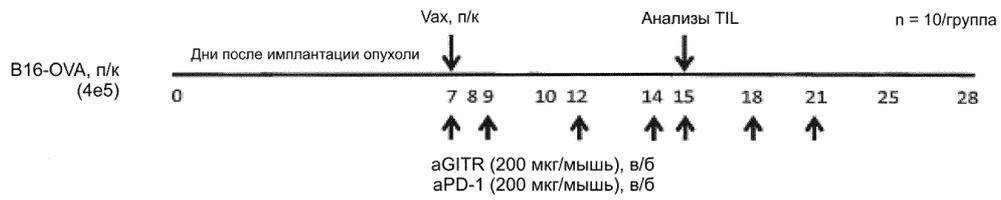
Фиг. 9D



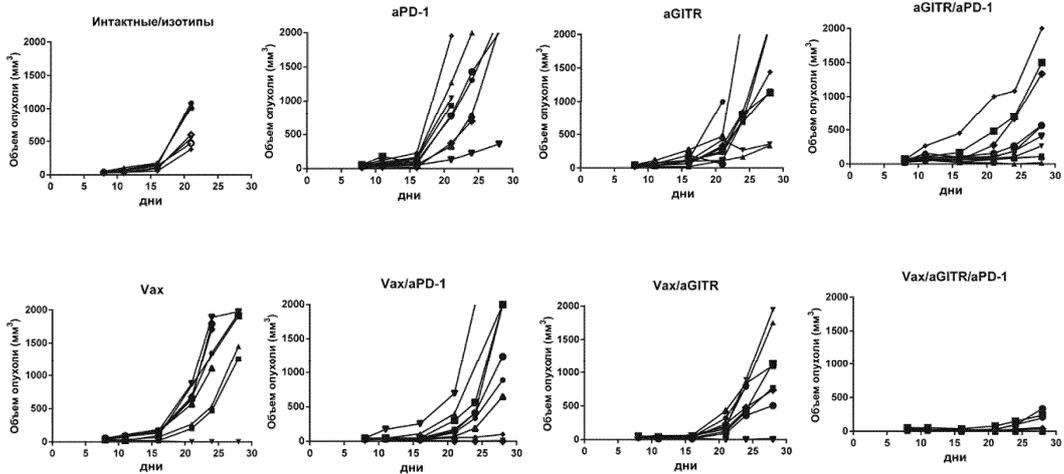
Фиг. 9E



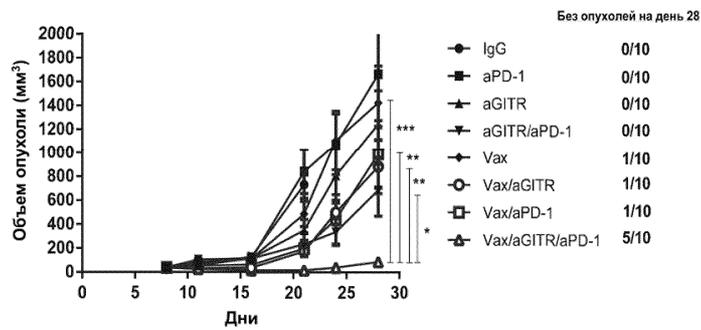
Фиг. 9F



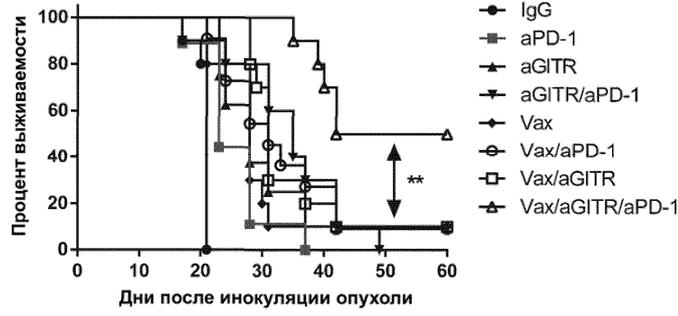
Фиг. 10А



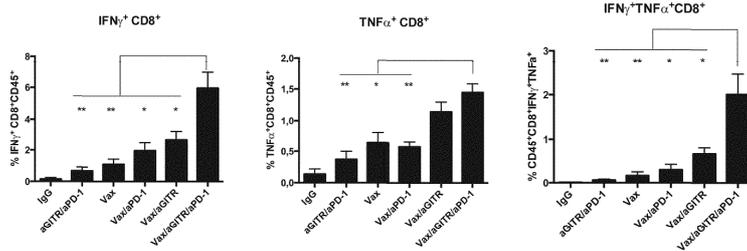
Фиг. 10В



Фиг. 10С

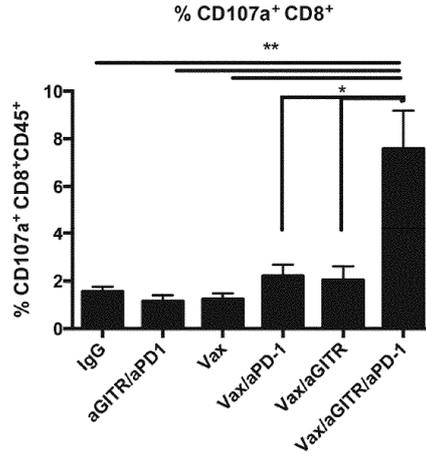


Фиг. 10D

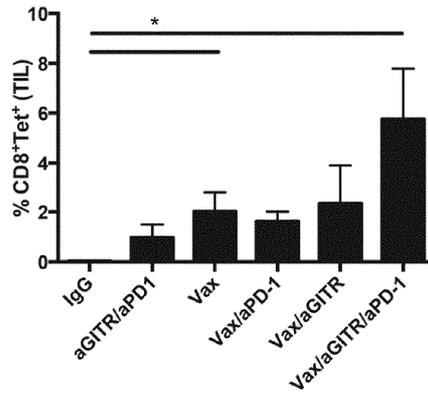


Стимулирование пептидным OVA-антигеном (SIINFEKL)

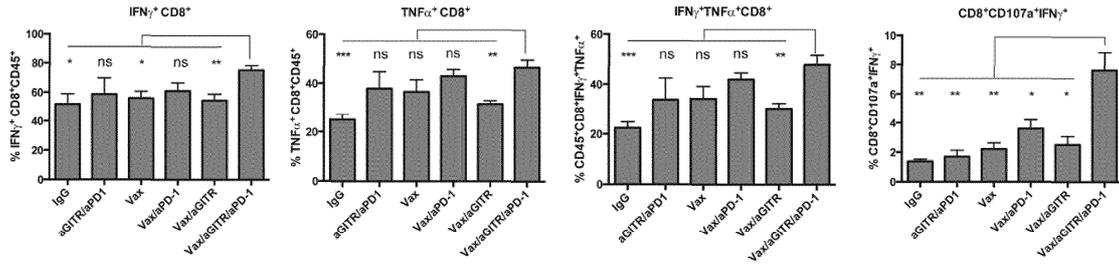
Фиг. 11A



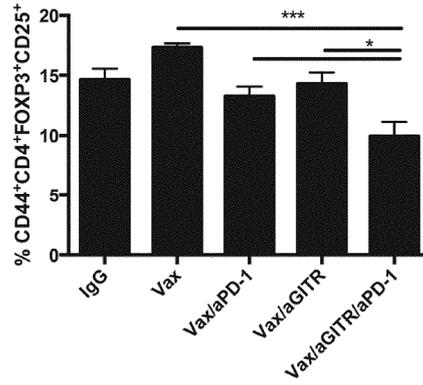
Фиг. 11B



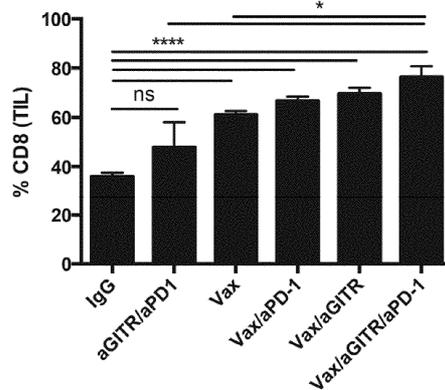
Фиг. 11C



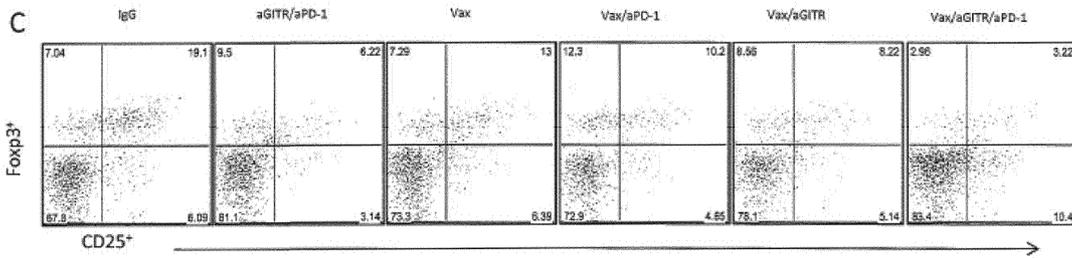
Стимулирование PMA/ION
Фиг. 11D



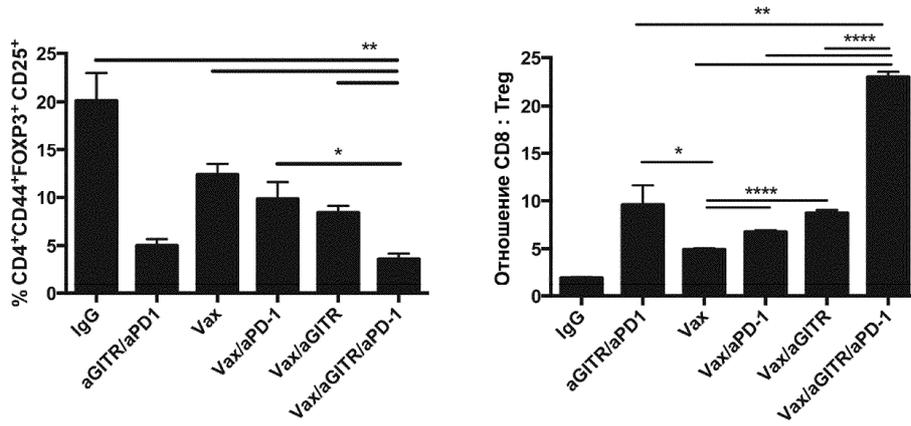
Фиг. 12A



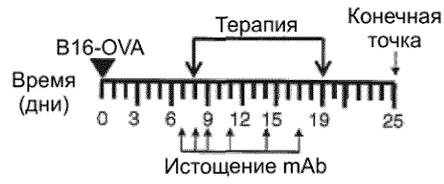
Фиг. 12B



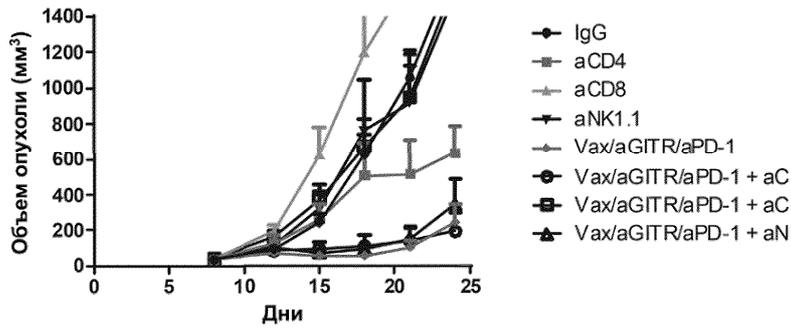
Фиг. 12C



Фиг. 12D



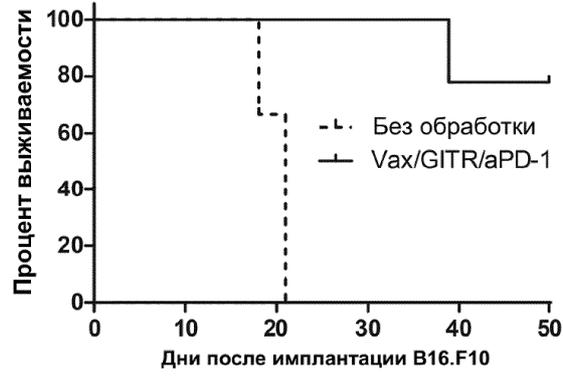
Фиг. 13А



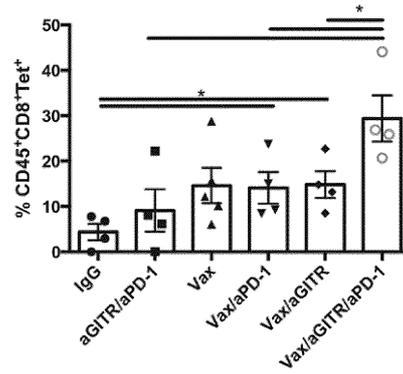
Фиг. 13В



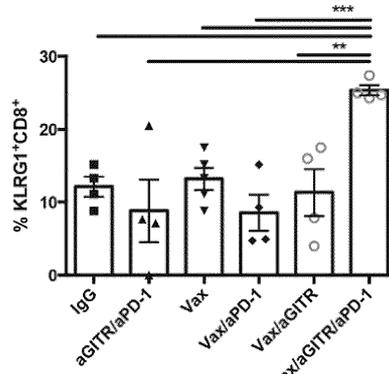
Фиг. 13С



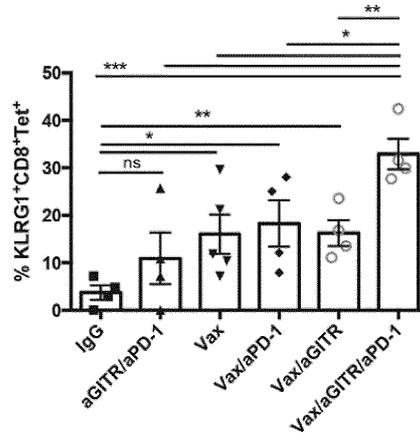
Фиг. 13D



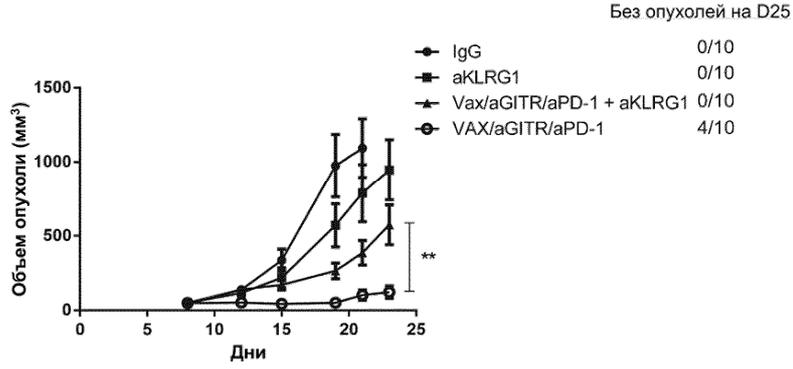
Фиг. 14А



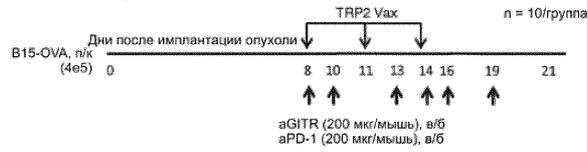
Фиг. 14В



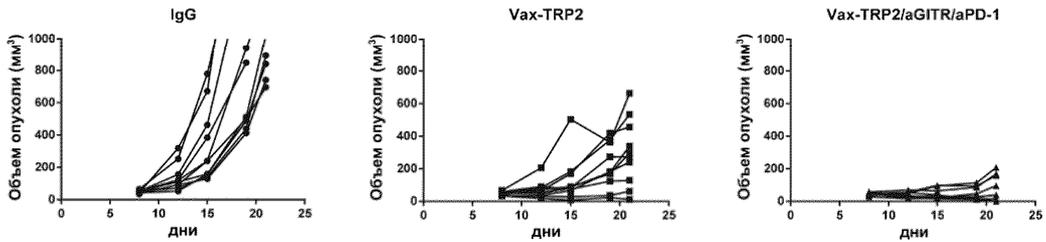
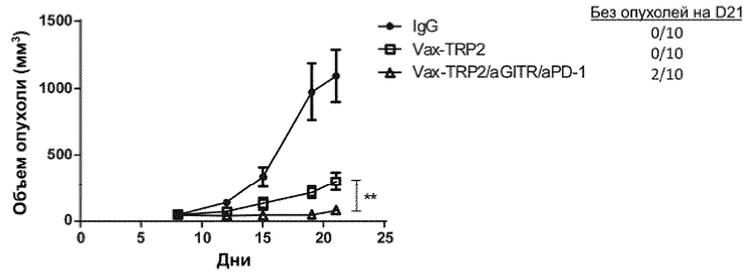
Фиг. 14С



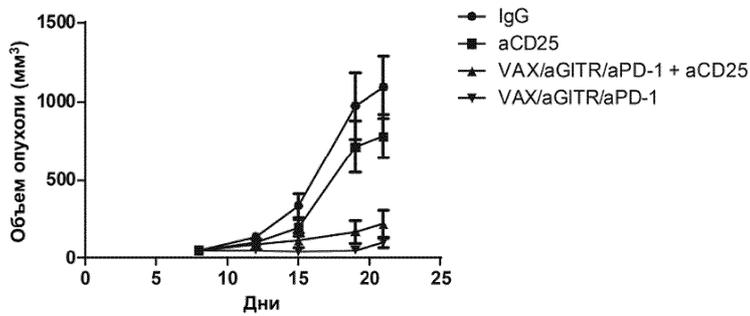
Фиг. 14D



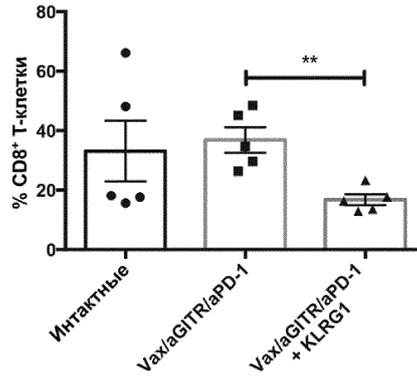
Фиг. 15A



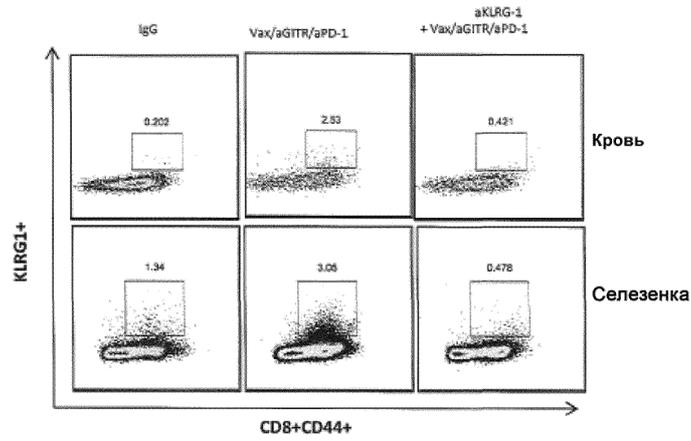
Фиг. 15B



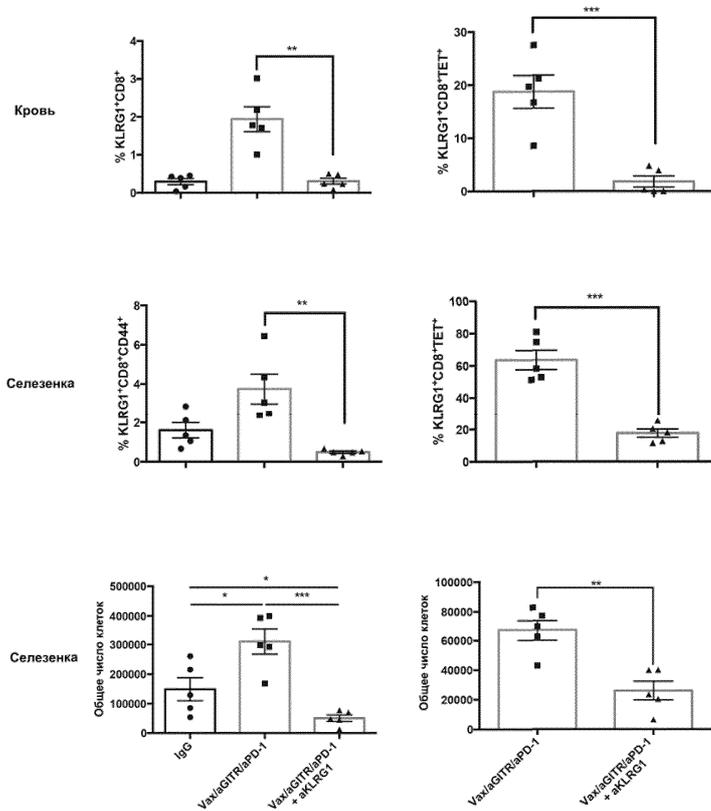
Фиг. 16



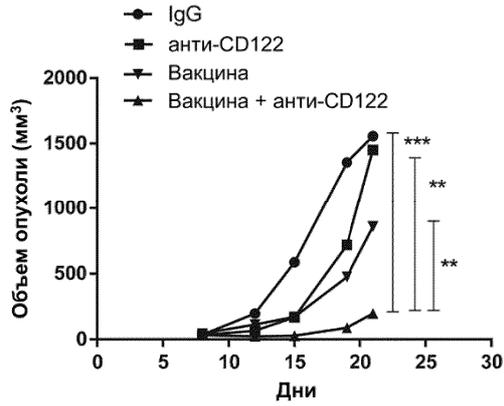
Фиг. 17А



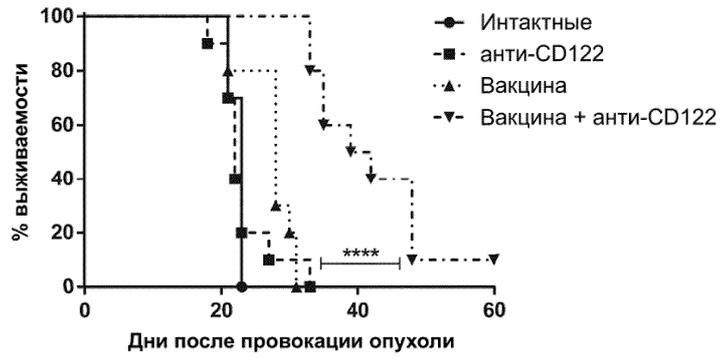
Фиг. 17В



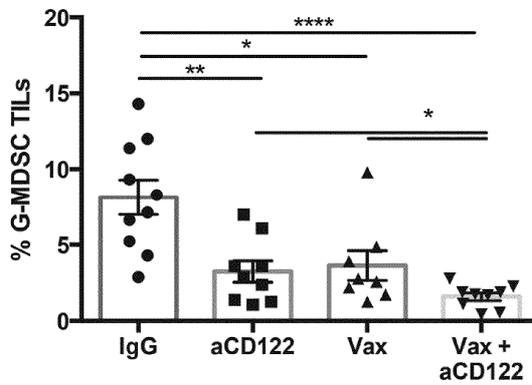
Фиг. 17С



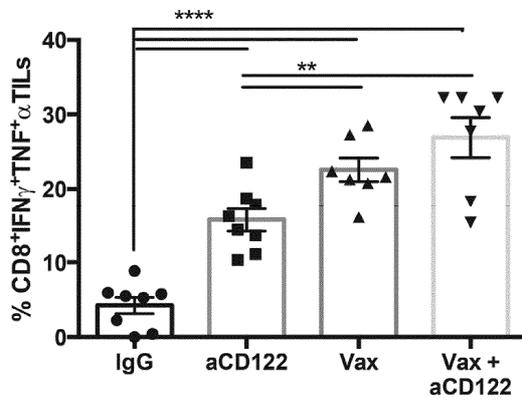
Фиг. 18А



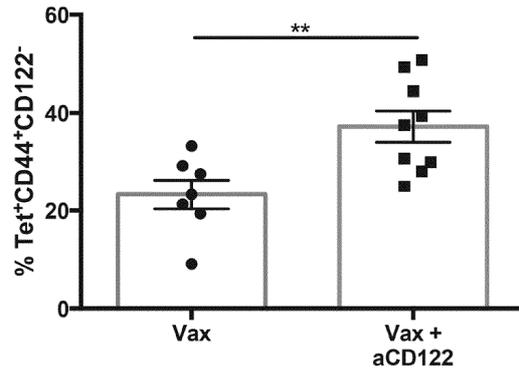
Фиг. 18В



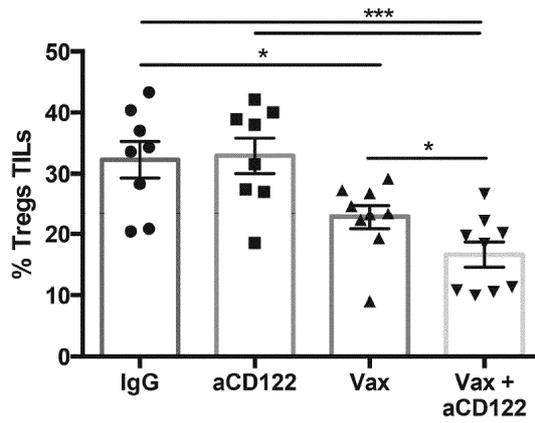
Фиг. 19А



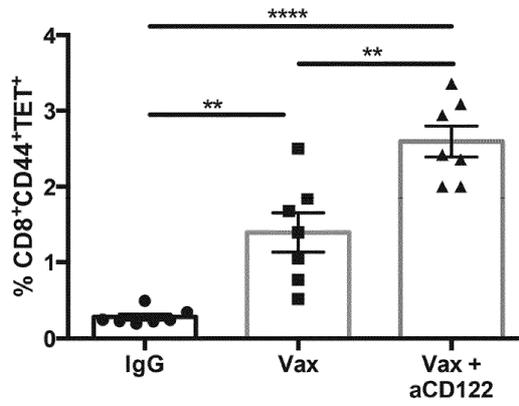
Фиг. 19В



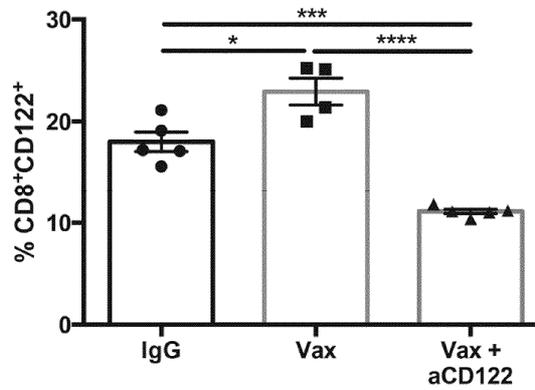
Фиг. 19С



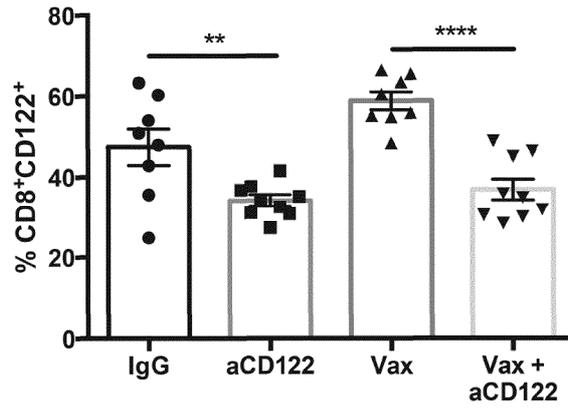
Фиг. 19D



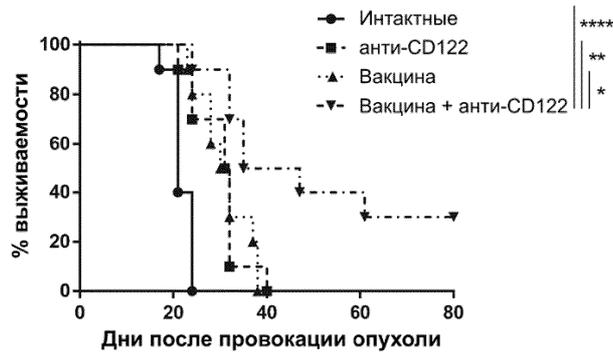
Фиг. 20А



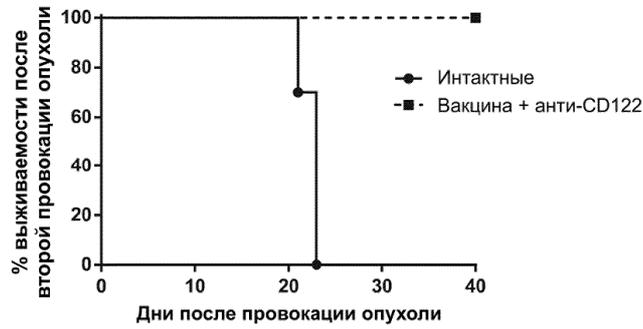
Фиг. 20В



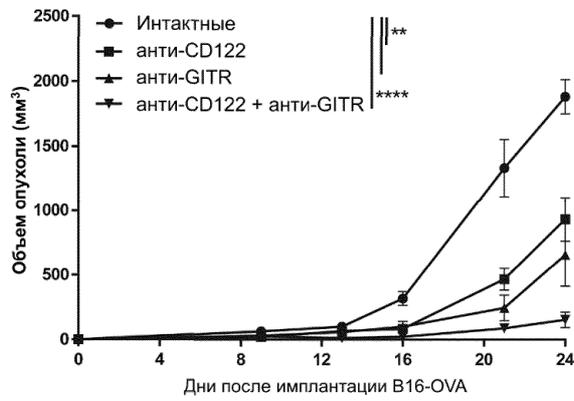
Фиг. 20С



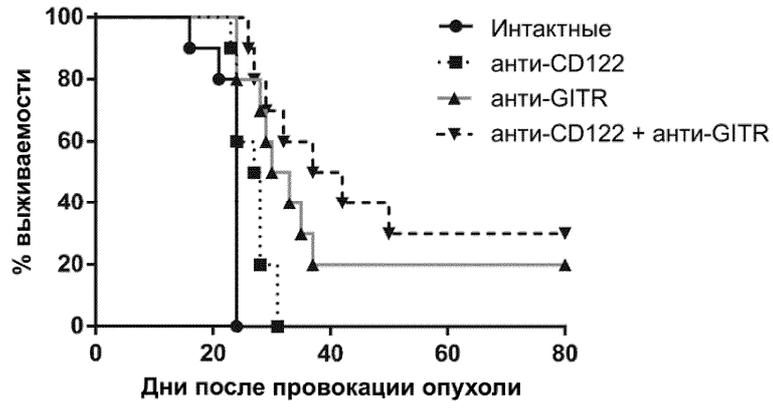
Фиг. 21А



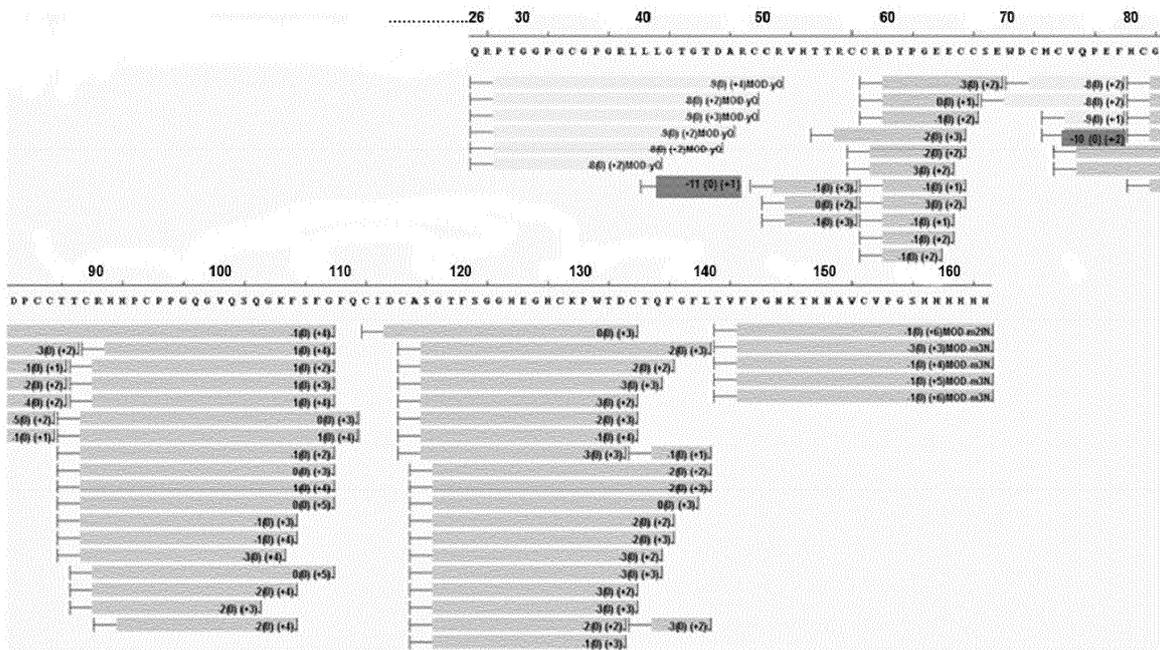
Фиг. 21В



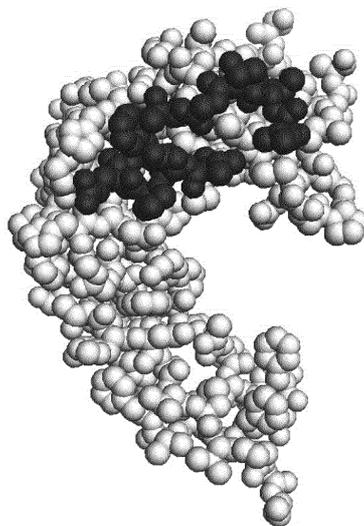
Фиг. 22А



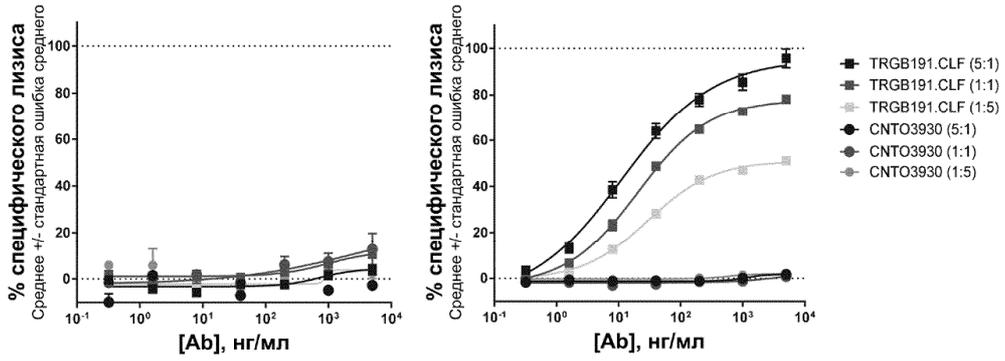
Фиг. 22В



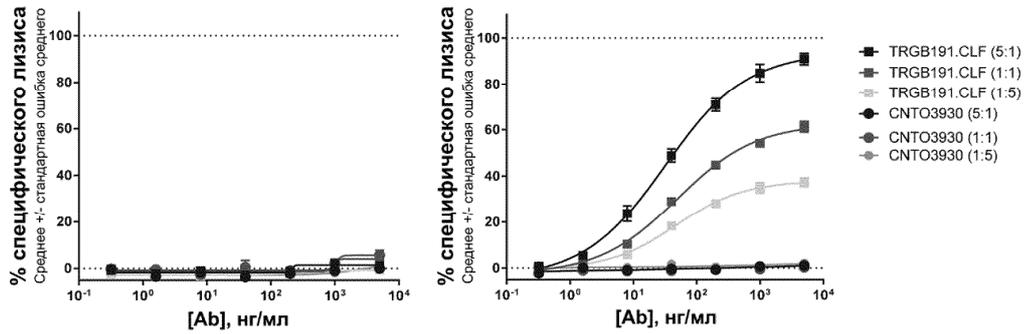
Фиг. 23



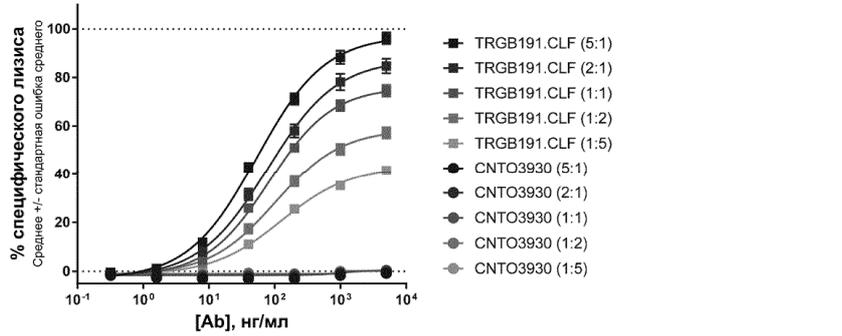
Фиг. 24



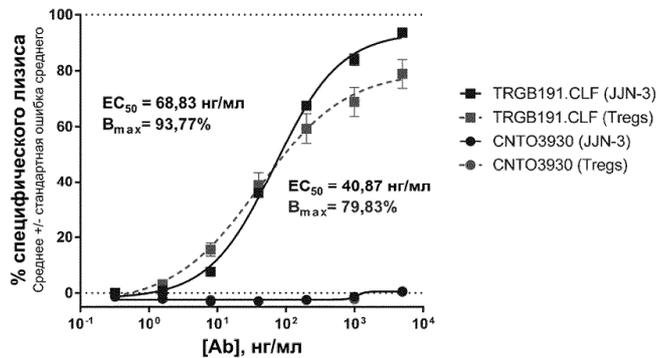
Фиг. 25А



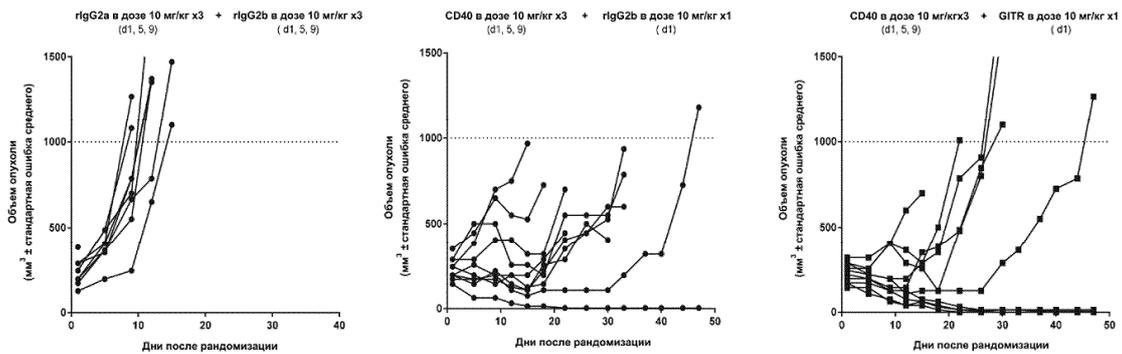
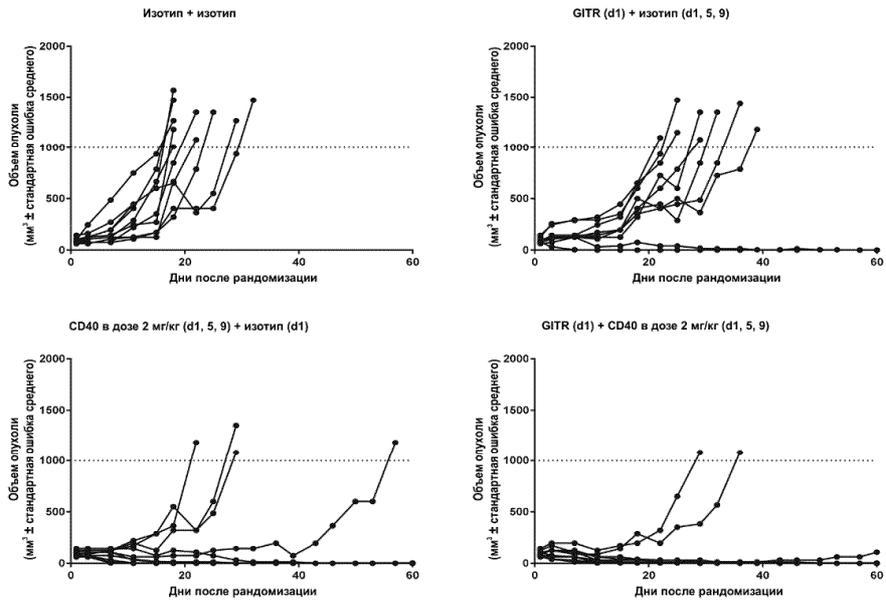
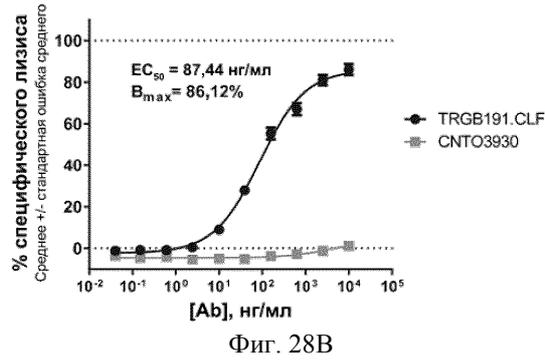
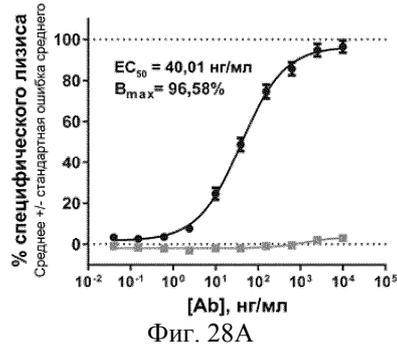
Фиг. 25В

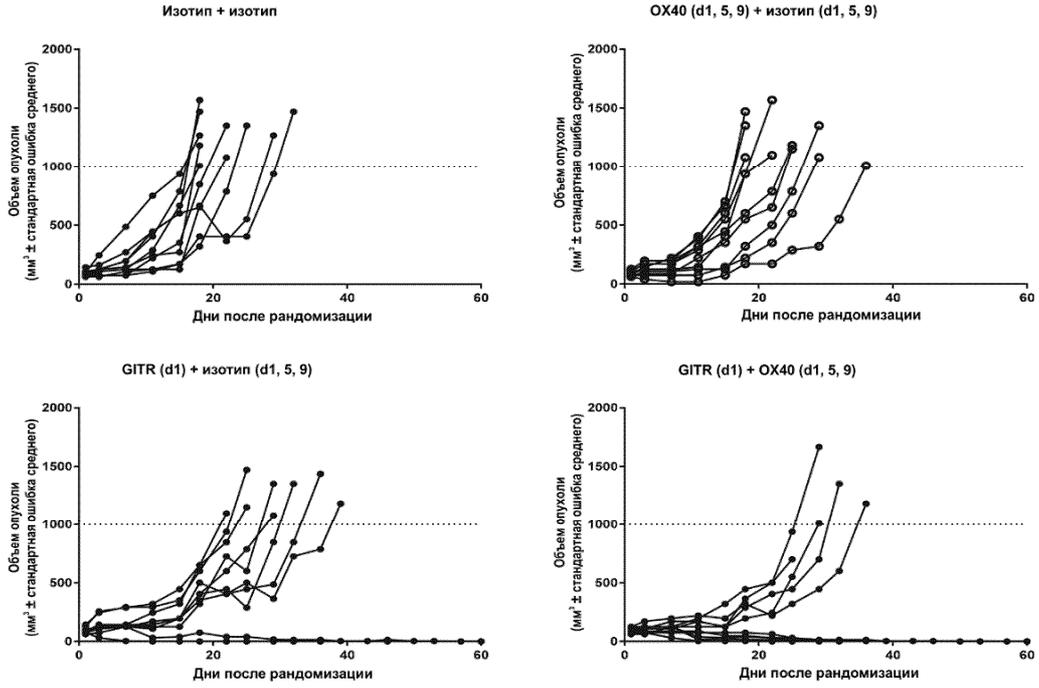


Фиг. 26

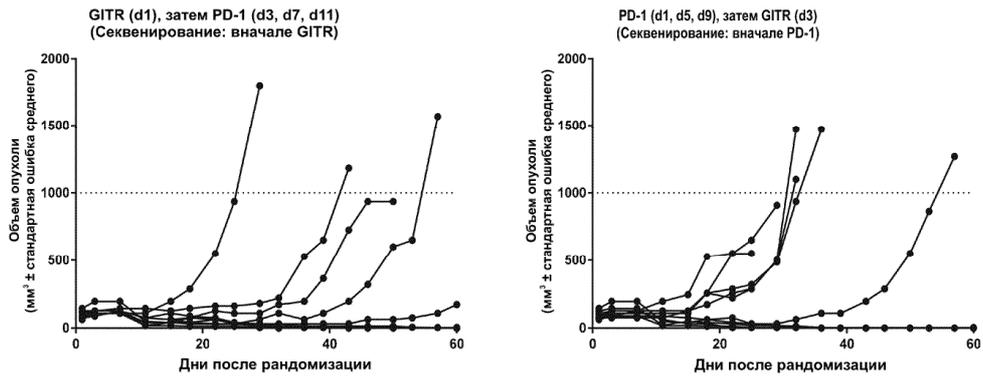


Фиг. 27





Фиг. 31



Фиг. 32

