

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190647** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.09.09

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.09.06

(54) **АНТИТЕЛА К KLRG1**

(31) **62/732,329**

(32) **2018.09.17**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/050110**

(87) **WO 2020/060781 2020.03.26**

(71) Заявитель:
АБКУРО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Гулла Стефано В., Томпсон Кеннет
Эван (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Лебедев В.В., Парамонова К.В.
(RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с лектиноподобным рецептором G1 клеток-киллеров (KLRG1). Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты пригодны для различных терапевтических или диагностических целей, включая лечение раковых заболеваний и повышение эффективности вакцин.

202190647
A1

202190647

A1

АНТИТЕЛА К KLRG1

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Область техники относится к ингибированию коингибиторного рецептора лимфоцитов — члена 1 подсемейства G лектиноподобных рецепторов клеток-киллеров (KLRG1).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Коингибиторные рецепторы лимфоцитов модулируют действие адаптивной иммунной системы, например Т-клеток и естественных клеток-киллеров в ответ на активирующие сигналы, например антигенные пептиды, в контексте главного комплекса тканевой совместимости (МНС), связывающегося с Т-клеточным рецептором (TCR). Коингибиторные рецепторы включают PD-1, LAG-3, TIM-3 и CTLA4. Действие коингибиторных рецепторов в целом осуществляется посредством связывания лиганда с внеклеточным доменом коингибиторного рецептора с последующим рекрутингом внутриклеточных фосфатаз иммунорецепторным тирозиновым ингибирующим мотивом (ITIM), расположенным во внутриклеточном домене коингибиторного рецептора. Действие коингибиторных рецепторов в целом направлено на ослабление иммунного ответа связывания TCR. В последние годы было показано, что средства, блокирующие деятельность коингибиторных рецепторов, могут быть использованы в качестве эффективного лечения онкологических и инфекционных заболеваний.

[0003] Лектиноподобный рецептор G1 естественных клеток-киллеров (KLRG1) представляет собой трансмембранный белок II типа, выступающий в качестве коингибиторного рецептора посредством модулирования активности Т-клеток и естественных клеток-киллеров. Его внеклеточная часть содержит домен лектина С-типа, известными лигандами которого являются кадгеринины, а его внутриклеточная часть содержит домен иммунорецепторного тирозинового ингибирующего мотива (ITIM), ответственный за совместное ингибирование передачи сигналов, опосредованной Т-клеточным рецептором (TCR). Лиганды KLRG1 могут представлять собой E-кадгерин, N-кадгерин, R-кадгерин или их комбинацию.

[0004] Рецепторный лектиноподобный рецептор G1 клеток-киллеров (KLRG1) экспрессируется на Т-клетках и естественных клетках-киллерах, при этом он связывается с лигандами на эпителиальных и мезенхимальных клетках. Было описано, что лиганд для KLRG1 представляет собой E-кадгерин, N-кадгерин и R-кадгерин.

[0005] У людей экспрессия KLRG1 ограничена клетками иммунных систем и, в частности, CD8-положительными Т-клетками, естественными клетками-киллерами и в меньшей степени CD4-положительными Т-клетками. Экспрессия KLRG1 была ассоциирована с поздним дифференцированным фенотипом. По мере дифференцировки антигенспецифических Т-клеток они приобретают повышенную экспрессию цитотоксических молекул и, следовательно, обладают повышенным цитотоксическим потенциалом. Биологическая функция KLRG1 заключается в подавлении цитотоксичности и пролиферации данных Т-клеток. Было доказано, что при раке и инфекционных заболеваниях он полезен для восстановления активности Т-клеток.

[0006] Как правило, существует потребность в обеспечении безопасных и эффективных способов лечения рака или инфекционных заболеваний. Модуляция активации цитотоксических (или CD8+) Т- и естественных клеток-киллеров, участвующих в данных нарушениях, может осуществляться посредством манипуляции с путем KLRG1.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В настоящем раскрытии представлена характеристика новых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают внеклеточный домен (ECD) KLRG1 и ингибируют его взаимодействие с лигандами E-кадгерином, N-кадгерином и R-кадгерином. Антитела, описанные в данном документе, были образованы посредством мышиной гибридомной технологии и могут быть гуманизированы посредством прививания их областей, определяющих комплементарность (CDR), на человеческий каркас. В настоящем раскрытии также представлены антитела или связывающие фрагменты, которые модулируют (например, активируют) CD8+ цитотоксические Т-клетки и естественные клетки-киллеры и осуществляют это посредством модулирования (например, нейтрализации) взаимодействия между KLRG1 и его лигандами. Антитела, описанные в данном документе, можно применять в качестве эффективных терапевтических средств для лечения рака, либо в качестве монотерапии, либо в комбинации с другими иммунотерапевтическими средствами (такими как антитела к PD-1, антитела к PD-L1, или антитела к CTLA4), или в комбинации с химиотерапевтическими средствами или противораковыми вакцинами. Антитела, описанные в данном документе, можно применять в качестве эффективных вариантов лечения инфекционных заболеваний или для усиления эффективности вакцин против инфекционных заболеваний.

[0008] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления антител называются ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 или ABC_G1N08. Другие варианты осуществления включают домен VH и/или VL фрагмента Fv ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 или ABC_G1N08. Дополнительные варианты осуществления включают один или более CDR любого из данных доменов VH и VL. Другие варианты осуществления включают фрагмент H3 домена VH ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 и ABC_G1N08.

[0009] В настоящем раскрытии также представлены композиции, содержащие антитела KLRG1, и их применение в способах модулирования иммунного ответа, включая способы лечения людей или животных. В конкретных вариантах осуществления, антитела к KLRG1 применяют в лечении или предупреждении рака посредством активации CD8+ цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров. Нарушения, восприимчивые к лечению композициями по настоящему изобретению, включают, без ограничения, рак и инфекционные заболевания.

[0010] Кроме того, антитела к KLRG1 можно применять диагностически для обнаружения KLRG1 или его фрагментов в биологическом образце. Количество обнаруженного KLRG1 может коррелировать с уровнем экспрессии KLRG1, который в свою очередь коррелирует со статусом активации лимфоцитов (например, цитотоксических Т-клеток или естественных клеток-киллеров) у субъекта.

[0011] В настоящем раскрытии также представлены выделенные нуклеиновые кислоты, которые содержат последовательность, кодирующую домен VH или VL из фрагмента Fv ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 и ABC_G1N08. Также представлены выделенные нуклеиновые кислоты, которые содержат последовательность, кодирующую один или более CDR из любых раскрытых в данном документе доменов VH и VL. В настоящем раскрытии также представлены векторы и клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты.

[0012] В настоящем документе дополнительно представлен способ получения новых доменов VH и VL и/или функциональных антител, содержащих все или часть таких доменов, образованных из доменов VH или VL ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 и ABC_G1N08.

[0013] Дополнительные аспекты настоящего раскрытия будут частично изложены в следующем описании и частично будут очевидны из описания, или могут быть изучены при применении настоящего изобретения на практике. Настоящее изобретение изложено и конкретно указано в прилагаемой формуле изобретения, и настоящее раскрытие никоим образом не должно толковаться как ограничение объема формулы изобретения. Следующее подробное описание включает иллюстративные представления различных вариантов осуществления изобретения, которые не ограничивают заявленное изобретение. Прилагаемые фигуры составляют часть данного описания и вместе с описанием служат только для иллюстрации различных вариантов осуществления и не ограничивают настоящее изобретение. Использование ссылок не является признанием того, что данные ссылки являются предшествующим уровнем техники для настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] На ФИГ. 1 показаны результаты анализа секреции интерферона-гамма (IFN γ), демонстрирующие, что антитела к KLRG1 активируют человеческие CD8+ Т-клетки.

[0015] На ФИГ. 2 показан результат анализа пролиферации Т-клеток CD8+, демонстрирующий, что антитела к KLRG1 индуцируют пролиферацию CD8+ Т-клеток.

[0016] На ФИГ. 3 показана взаимосвязь между результатами анализа секреции IFN γ в CD8+ Т-клетках, обработанных антителами к KLRG1, и блокирующим действием (показанным в IC50) таких антител.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Определения

[0017] Применяемый в данном раскрытии термин «антитело» относится к иммуноглобулину или его фрагменту или производному, и охватывает любой полипептид, содержащий антигенсвязывающий участок, независимо от того, производится ли он *in vitro* или *in vivo*. Термин включает без ограничения поликлональные, моноклональные, моноспецифические, полиспецифические, неспецифические, гуманизированные, одноцепочечные, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутированные и привитые антитела. Если иное не изменено термином «интактные», как в выражении «интактные антитела», для целей настоящего описания, термин «антитело» также включает фрагменты антител, такие как Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb и другие фрагменты антител, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию, т.е. Способность специфически связывать KLRG1. Как правило, такие фрагменты будут содержать антигенсвязывающий домен.

[0018] Термины «антигенсвязывающий домен», «антигенсвязывающий фрагмент» и «связывающий фрагмент» относятся к части молекулы антитела, которая содержит аминокислоты, отвечающие за специфическое связывание между антителом и антигеном. В случаях, когда антиген является крупным, антигенсвязывающий домен может связываться только с частью антигена. Часть молекулы антигена, отвечающая за специфические взаимодействия с антигенсвязывающим доменом, называется «эпитоп» или «антигенная детерминанта».

[0019] Антигенсвязывающий домен обычно содержит переменную область легкой цепи антитела (VL) и переменную область тяжелой цепи антитела (VH), тем не менее, он не обязательно должен включать обе из них. Например, так называемый фрагмент антитела Fd состоит только из домена VH, но все еще сохраняет некоторую антигенсвязывающую функцию интактного антитела.

[0020] Термин «репертуар» относится к генетически разнообразному набору нуклеотидов, полностью или частично полученных из последовательностей, кодирующих экспрессированные иммуноглобулины. Последовательности образованы посредством *in vivo*

перестройки, например, сегментов V, D и J для цепей H и, например, сегментов V и J для цепей L. В качестве альтернативы, последовательности могут быть образованы из клеточной линии посредством стимуляции *in vitro*, в ответ на которую происходит перестройка. В качестве альтернативы, часть или все последовательности могут быть получены посредством объединения, например, неперестроенных сегментов V с сегментами D и J, посредством нуклеотидного синтеза, рандомизированного мутагенеза и других способов, например, описанных в патенте США № 5,565,332.

[0021] Термины «специфическое взаимодействие» и «специфическое связывание» относятся к двум молекулам, образующим комплекс, относительно стабильный в физиологических условиях. Специфическое связывание характеризуется высокой аффинностью и емкостью от низкой до умеренной, в отличие от неспецифического связывания, которое обычно имеет низкое сродство с емкостью от умеренной до высокой. Как правило, связывание считается специфическим, если константа аффинности K_A превышает $10^6 M^{-1}$ или более предпочтительно превышает $10^8 M^{-1}$. При необходимости, неспецифическое связывание может быть снижено без существенного влияния на специфическое связывание посредством изменения условий связывания. Подходящие условия связывания, такие как концентрация антитела, ионная сила раствора, температура, время, отведенное для связывания, концентрация блокирующего средства (например, сывороточный альбумин, молочный казеин) и т. д., могут быть оптимизированы квалифицированным специалистом с использованием рутинной методики.

[0022] Фраза «по существу как изложено» означает, что значимая CDR, домен VH или VL по настоящему изобретению будут либо идентичны, либо иметь несущественные отличия в указанных областях (например, CDR) от последовательности, которая изложена. Несущественные различия включают незначительные изменения аминокислоты, такие как замены 1 или 2 из 5 любых аминокислот в последовательности указанной области.

[0023] Термин «активность KLRG1» относится к одной или более лимфоцитарной коингибиторной активности, связанной с KLRG1. Например, активность KLRG1 может означать моделирование активации цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров.

[0024] Термин «модуляция» и его сопряжения относятся к снижению или повышению активности KLRG1, связанному с активацией Т-клеток и естественных клеток-киллеров вследствие его взаимодействия с антителом к KLRG1, где снижение или повышение относится к активности KLRG1 в отсутствие того же антитела. Снижение или повышение активности предпочтительно составляет по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более. Если активность KLRG1 снижается, термины «модуляторный» и «модулировать» являются взаимозаменяемыми с терминами «ингибиторный» и «ингибировать». Если активность KLRG1 повышается, термины «модуляторный» и «модулировать» являются взаимозаменяемыми с терминами «активирующий» и «активировать». Активность KLRG1 может быть определена количественно с использованием анализов активации Т-клеток и естественных клеток-киллеров, таких как описанные в примере 6.

[0025] Термины «лечение» и «терапевтический способ» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим/превентивным мерам. Лица, нуждающиеся в лечении, могут включать людей, уже страдающих определенным заболеванием, а также тех, кто может в конечном итоге приобрести данное расстройство (т.е. тех, кто нуждается в превентивных мерах).

[0026] Термин «эффективное количество» относится к дозировке или количеству, которое достаточно для снижения активности KLRG1 для обеспечения устранения симптомов у пациента или для достижения необходимого биологического результата, например, снижения активности KLRG1, модулирования реакции совместного ингибирования лимфоцитов, повышенной активации цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-

киллеров или повышение высвобождения IFN γ посредством цитотоксических Т-клеток или естественных клеток-киллеров.

[0027] Термин «выделенный» относится к молекуле, которая по существу свободна от своего естественного окружения. Например, выделенный белок практически не содержит клеточный материал или другие белки из клетки или источника ткани, из которого он получен. Термин «выделенный» также относится к препаратам, в которых выделенный белок является достаточно чистым для введения в качестве фармацевтической композиции, или по меньшей мере на 70-80% (вес/вес) чист, более предпочтительно по меньшей мере на 80-90% (вес/вес) чист, еще более предпочтительно на 90-95% чист; и, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (вес/вес) чист.

Антитела к KLRG1

[0028] В настоящем раскрытии представлены антитела к KLRG1, которые содержат новые антигенсвязывающие фрагменты.

[0029] Как правило, антитела могут быть получены, например, с использованием традиционных гибридомных методик (Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499), способов рекомбинантной ДНК (патент США № 4,816,567) или фаговый дисплей, осуществляемый с библиотеками антител (Clackson et al. (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597). Другие методики получения антител см. также в *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным источником, видом происхождения или способом получения.

[0030] Интактные антитела, также известные как иммуноглобулины, как правило, представляют собой тетрамерные гликозилированные белки, состоящие из двух легких (L) цепей, каждая из которых имеет массу приблизительно 25 кДа, и две тяжелые (H) цепи, каждая из которых имеет массу приблизительно 50 кДа. В антителах обнаружены два типа легкой цепи, обозначенные как λ -цепь и κ -цепь. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей, иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам: A, D, E, G и M, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

[0031] Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулины хорошо известны в данной области. Обзор структуры антитела см. выше в Harlow et al. Вкратце, каждая легкая цепь состоит из N-концевого переменного домена (VL) и константного домена (CL). Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевого варибельного домена (VH), трех или четырех константных доменов (CH) и шарнирного участка. Домен CH, наиболее близкий к VH, обозначается как CH1. Домены VH и VL состоят из четырех областей относительно консервативной последовательности, называемых каркасные области (FR1, FR2, FR3, и FR4), которые образуют каркас для трех областей гиперварибельной последовательности, называемых определяющие комплементарность области (CDR). CDR содержат большинство остатков, ответственных за специфические взаимодействия с антигеном. Три CDR называются CDR1, CDR2 и CDR3. Компоненты CDR на тяжелой цепи обозначаются как H1, H2 и H3, тогда как составляющие CDR на легкой цепи обозначаются как L1, L2 и L3, соответственно. CDR3 и, особенно, H3, являются наибольшим источником молекулярного разнообразия в антигенсвязывающем домене. Например, H3 может содержать всего два остатка аминокислоты или больше 26.

[0032] Фрагмент Fab (антигенсвязывающий фрагмент) состоит из доменов VH-CH1 и VL-CL, ковалентно связанных посредством дисульфидной связи между константными областями. Для преодоления тенденции нековалентно связанных доменов VH и VL в Fv диссоциировать при совместной экспрессии в клетке-хозяине может быть сконструирован так называемый одноцепочечный (sc) Fv-фрагмент (scFv). В scFv гибкий и достаточно длинный полипептид связывает либо C-конец VH с N-концом VL, либо C-конец VL с N-концом VH. Чаще

всего в качестве линкера используется пептид из 15 остатков (Gly4Ser)₃, но в данной области также известны другие линкеры.

[0033] Разнообразие антител является результатом комбинаторной сборки множества генов зародышевой линии, кодирующих переменные области, и различных соматических явлений. Соматические явления включают рекомбинацию переменных генных сегментов с разнообразием (D) и присоединением (J) генных сегментов для создания полной области VH и рекомбинацию переменных и соединяющихся сегментов гена для создания полной области VL. Сам процесс рекомбинации неточен, что приводит к потере или добавлению аминокислот в соединениях V(D)J. Данные механизмы разнообразия возникают в развивающихся В-клетках до воздействия антигена. После антигенной стимуляции гены экспрессируемых антител в В-клетках претерпевают соматическую мутацию.

[0034] На основании расчетного количества генных сегментов зародышевой линии, случайной рекомбинации данных сегментов и случайного объединения VH-VL может быть получено до $1,6 \times 10^7$ различных антител (Fundamental Immunology, 3rd ed., ed. Paul, Raven Press, New York, N.Y., 1993). Если учитываются другие процессы, которые вносят вклад в разнообразие антител (например, соматические мутации), считается, что потенциально может образовываться более 1×10^{10} различных антител (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1995). Вследствие множества процессов, вовлеченных в разнообразие антител, очень маловероятно, что независимо образованные антитела будут иметь идентичные аминокислотные последовательности в CDR.

[0035] В настоящем раскрытии представлены новые CDR, образованные из библиотеки генов человеческого иммуноглобулина. Структура для несения CDR обычно будет представлять собой тяжелую или легкую цепь антитела или ее часть, в которой CDR расположена в месте, соответствующем CDR встречающихся в природе VH и VL. Структура и расположение переменных доменов иммуноглобулина могут быть определены, например, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md., 1991.

[0036] Аминокислотные последовательности доменов VH и VL гуманизированных антител к KLRG1 изложены в списке последовательностей и пронумерованы, как указано в таблице 1.

Таблица 1. аминокислотные последовательности переменных областей для гуманизированных антител к KLRG1

SEQ ID NO. mAb VH / VL Аминокислотная последовательность

SEQ ID NO:1 ABC_HG1N01VH

QVILKESGPGVLKPTQTLTCTFSGFSLTTFGMGIGWIRQPPGKALEWLAHIWWNDDKSY
NSALKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTIYYGNYLTFYAMEHWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:2 VL

DILMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPPTFGAGTKLELKRTV

SEQ ID NO:3 ABC_HG1N02

VH

QVTLKESGPGVLKPTQTLTCTFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDK
WYELALKSRLTISKDSSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARVIYYGSRSAYYSMDYWPGTTVTVS
S

SEQ ID NO:4 VL

DILMTQSPLSLPVTGPGEPAISCSKSSQSIVHSNGHTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPVTFGAGTKLELKRTV

SEQ ID NO:5 ABC_HG1N07VH

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWIRQTPGKGLEWATISESGNYNN
YPDNVKGRILTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCVRDDWEGRAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:6 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRDIGSSLNHWYQQKPGGAPKRLIYATSSLD SGVPKR
FSGSGSGTDFTLTISLQSEDFATYYCLQYASSPWTFGQGTKVEIKRTV

[0037] Конкретные неограничивающие иллюстративные варианты осуществления антитела обозначаются как ABC_HG1N01, ABC_HG1N02 и ABC_HG1N07. Аминокислотные последовательности CDR в доменах VH и VL иллюстративных вариантов осуществления изложены в списке последовательностей и пронумерованы, как указано в таблице 2.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR для гуманизированных антител к KLRG1

SEQ ID NO. mAb CDR Аминокислотная последовательность

SEQ ID NO:7 ABC_HG1N01CDR-H1 GFSLTTFGM

SEQ ID NO:8 CDR-H2 WWNDD

SEQ ID NO:9 CDR-H3 TIYYGNLTFYAMEH

SEQ ID NO:10 CDR-L1 RSSQNIVHSNGNTYLE

SEQ ID NO:11 CDR-L2 KVS NRFS

SEQ ID NO:12 CDR-L3 FQGSHVPPT

SEQ ID NO:13 ABC_HG1N02CDR-H1 GFSLSTFGM

SEQ ID NO:14 CDR-H2 WWDDD

SEQ ID NO:15 CDR-H3 VIYYGSRSA YYSMDY

SEQ ID NO:16 CDR-L1 KSSQSIVHSNGHTYLE

SEQ ID NO:17 CDR-L2 KVS NRFS

SEQ ID NO:18 CDR-L3 FQGSHVPVT

SEQ ID NO:19 ABC_HG1N07CDR-H1 GFTFRNY

SEQ ID NO:20 CDR-H2 SESGNY

SEQ ID NO:21 CDR-H3 DDWEGRAMDY

SEQ ID NO:22 CDR-L1 RASRDIGSSLN

SEQ ID NO:23 CDR-L2 ATSSLDS

SEQ ID NO:24 CDR-L3 LQYASSPWT

[0038] Аминокислотные последовательности доменов VH и VL мышинных антител к KLRG1 изложены в списке последовательностей и пронумерованы, как указано в таблице 3

Таблица 3. Аминокислотные последовательности переменной области для мышинных антител к KLRG1

SEQ ID NO.	mAb	VH / VL	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:25	ABC_G1N01	VH	QVILKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLTTFGMGIGWIRHPGKALEWLAHIWWNDKSY NSALKSRLTISKDTSKNQVFLRLANVATADTATYYCARTIYYGNYLTFYAMEHWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO:26		VL	DVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIHVSNGNTYLEWYLLKPGQSPKLLIFKVSNRFSG VPDKFSGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:27	ABC_G1N02	VH	QVTLKESGPGILQPSQTLTCSVSGFSLSTFGMGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDK WYELALKSRLTISKDSSKNQVFLKIANVDTADTATYFCARVIYYGSRSAIYSSMDYWGPGTSTVTVSS
SEQ ID NO:28		VL	DVLMTQTPLSLPVSLGAQASISCKSSQSIHVSNGHTYLEWYLQKPGQSPKILYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYYCFQGSHVPVTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:29	ABC_G1N03	VH	QVHLQQSGPELVKPGASVKLSCASGDTFTTYDITWVKQRPGQGLEWIGWIYPKDGRGRTQ NSEKFKDKATLTVDTSSITAYMELHSLTSEDSAVYFCARRGQFGPYFDHWGQGSTLTVSS
SEQ ID NO:30		VL	VIQMTQSSSFLSASLGGRVSIKCRASDHIYNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGIPSR FSGGGSGKDYTLTIISLQTEDIASYYCQYWNTPPTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO:31	ABC_G1N04	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFSFSTFGMHWRVQVPEKGLEWVAYISSGSYSIF YADSVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCTRTRDSGSSPHYFDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:32		VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASKSVDSYGISFMNWFQQKPGQSPKLLIYGASNRGSG VPAFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEGPPTFGTGTKLELR
SEQ ID NO:33	ABC_G1N05	VH	EVLLMESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPDKRLEWVATISSSGRYTF YPDNVKGRFTISRDNKNTLYLQVSNLKSSEDAMYCSRTGVTTVVFTDYFDYWGQGTSTLTVSS
SEQ ID NO:34		VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGNSLNWLQQGPDGTIKRLIYATSSLDGVPKR FSGSRSGSTYSLTISSEDFVAYYCLQYLSSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:35	ABC_G1N06	VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTHAVHWVRQSPGKGLDWLGVIWSSGNTDY NAAFISRLTISKDNSKQVFFKMNSLQADDTAIYYCVRLLLPAVDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:36		VL	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSVSSTYLHWYRQKPGSSPKLWIYSTSTLASGVPV RFRGSGSGTSTYSLTISSEDAEATYYCHQYRRSPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:37 ABC_G1N07 VH
 EVQLVESGGGLV \overline{K} PGGSLKLSCTASGFTFRNYAMSWVRQTPEKRL \overline{E} W \overline{W} ATISESGNYNN
 YPDNVKGR \overline{L} TISRDN \overline{A} KN \overline{N} LYLQMSLLKSEDTAMY \overline{Y} CVRDDWEGRAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:38 VL
 GIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASRDIGSSLNWLQQKPDGTIKRLIYATSSLD \overline{S} GVPKR
 FSGSRSGTDYSLTISSELEDFVDYFCLQYASSPWTFGGG \overline{T} KLEIK

SEQ ID NO:39 ABC_G1N08 VH
 QVQLQQSGAELAKPGASVKLSCKASGYTFTSYFLHWVKQRPGQGLEWIGYMN \overline{P} SSGYTK
 CNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQVSSLT \overline{Y} EDSAV \overline{Y} YCARDRIGYWDFD \overline{W} WTGTTVTVSS

SEQ ID NO:40 VL
 DVVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYAS \overline{N} RYTGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTITNMQSEDLADYFCQQYSSYLTFGAGTKL \overline{D} LK

[0039] Конкретные неограничивающие иллюстративные варианты осуществления антитела обозначаются как ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 и ABC_G1N08. Аминокислотные последовательности CDR в доменах VH и VL иллюстративных вариантов осуществления изложены в списке последовательностей и пронумерованы, как указано в таблице 4.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности CDR для мышинных антител к KLRG1

SEQ ID NO.	mAb	CDR	Последовательность
SEQ ID NO:41	ABC_G1N01	CDR-H1	GFSLTTFGM
SEQ ID NO:42		CDR-H2	WWNDD
SEQ ID NO:43		CDR-H3	TIYYGN \overline{Y} LTFYAMEH
SEQ ID NO:44		CDR-L1	RSSQNIVHSNGNTYLE
SEQ ID NO:45		CDR-L2	KVSNRFS
SEQ ID NO:46		CDR-L3	FQGSHVPPT
SEQ ID NO:47	ABC_G1N02	CDR-H1	GFSLSTFGM
SEQ ID NO:48		CDR-H2	WWDDD
SEQ ID NO:49		CDR-H3	VIYYGSR \overline{S} AYYSMDY
SEQ ID NO:50		CDR-L1	KSSQSIVHSNGHTYLE
SEQ ID NO:51		CDR-L2	KVSNRFS
SEQ ID NO:52		CDR-L3	FQGSHVPVT
SEQ ID NO:53	ABC_G1N03	CDR-H1	GDTFTTYDIT
SEQ ID NO:54		CDR-H2	YPKDGR
SEQ ID NO:55		CDR-H3	RGQFGPYFDH
SEQ ID NO:56		CDR-L1	RASDHIYNWLA

SEQ ID NO:57	CDR-L2	GATSLET
SEQ ID NO:58	CDR-L3	RGQFGPYFDH
SEQ ID NO:59	ABC_G1N04 CDR-H1	GFSFSTF
SEQ ID NO:60	CDR-H2	SSGSYS
SEQ ID NO:61	CDR-H3	TRTRDSGSSPHYFDY
SEQ ID NO:62	CDR-L1	RASKSVDSYGISFMN
SEQ ID NO:63	CDR-L2	GASNRGS
SEQ ID NO:64	CDR-L3	QQSKEGPFT
SEQ ID NO:65	ABC_G1N05 CDR-H1	GFTFSSY
SEQ ID NO:66	CDR-H2	SSSGRY
SEQ ID NO:67	CDR-H3	TGVTTVVFTDYFDY
SEQ ID NO:68	CDR-L1	SQDIGNS
SEQ ID NO:69	CDR-L2	SSLDS
SEQ ID NO:70	CDR-L3	LQYLSSPPTF
SEQ ID NO:71	ABC_G1N06 CDR-H1	GFSLTTH
SEQ ID NO:72	CDR-H2	WSGGN
SEQ ID NO:73	CDR-H3	LLLPAMDY
SEQ ID NO:74	CDR-L1	TATSSVSSTYLH
SEQ ID NO:75	CDR-L2	STSTLAS
SEQ ID NO:76	CDR-L3	HQYRRSPYT
SEQ ID NO:77	ABC_G1N07 CDR-H1	GFTFRNY
SEQ ID NO:78	CDR-H2	SESGNY
SEQ ID NO:79	CDR-H3	DDWEGRAMDY
SEQ ID NO:80	CDR-L1	RASRDIGSSLN
SEQ ID NO:81	CDR-L2	ATSSLDS
SEQ ID NO:82	CDR-L3	LQYASSPWT
SEQ ID NO:83	ABC_G1N08 CDR-H1	GYTFTSY
SEQ ID NO:84	CDR-H2	NPSSGY
SEQ ID NO:85	CDR-H3	DRIGYWDFDV
SEQ ID NO:86	CDR-L1	KASQNVGTAVA

SEQ ID NO:87	CDR-L2	SASNRYT
SEQ ID NO:88	CDR-L3	QQYSSYLT

[0040] Антитела к KLRG1 могут необязательно содержать константные области антитела или их части. Например, домен VL может иметь константные домены легкой цепи антитела, прикрепленные у его С-конца, включая человеческие цепи С_к или С_л. Аналогичным образом, специфический антигенсвязывающий домен на основе домена VH может присоединять всю или часть тяжелой цепи иммуноглобулина, полученной из любого изотопа антитела, например, IgG, IgA, IgE и IgM и любой из подклассов изотопов, которые включают без ограничения IgG1 и IgG4. В иллюстративных вариантах осуществления антитела ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 и ABC_G1N08 содержат С-концевые фрагменты тяжелой и легкой цепей человеческих IgG1 λ или IgG1 κ . ДНК и аминокислотные последовательности для С-концевого фрагмента хорошо известны в данной области (см., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md., 1991).

[0041] Определенные варианты осуществления включают домен VH и/или VL фрагмента Fv из ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 и ABC_G1N08. Следующие варианты осуществления содержат по меньшей мере один CDR любого из данных доменов VH и VL. Антитела, содержащие по меньшей мере одну последовательность CDR, изложенную в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 и SEQ ID NO:38, входят в объем настоящего изобретения. Один вариант осуществления, например, содержит фрагмент H3 домена VH антител, выбранных по меньшей мере из одного ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 и ABC_G1N08.

[0042] В определенных вариантах осуществления домены VH и/или VL могут быть модифицированы на уровне генов зародышевой линии, т.е. каркасные области (FR) данных доменов мутированы с использованием традиционные способы молекулярной биологии для соответствия тем, которые производятся клетками зародышевой линии. В других вариантах осуществления каркасные последовательности остаются расходясь с консенсусом последовательностей зародышевой линии.

[0043] В определенных вариантах осуществления антитела специфически связывают эпитоп в ECD человеческого или мышинного KLRG1, с аффинностью, выраженной в KD, по меньшей мере около 2 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ или 5 пМ. Аминокислотные последовательности ECD и KLRG1 человека или яванского макака изложены в SEQ ID NO:89 и SEQ ID NO:90, представленных в таблице 6.

[0044] Предполагается, что антитела по настоящему изобретению могут также связываться с другими белками, включая, например, рекомбинантные белки, содержащие весь или часть KLRG1.

[0045] Специалисту в данной области будет понятно, что антитела по настоящему изобретению можно использовать для обнаружения, измерения и ингибирования белков, которые несколько отличаются от KLRG1. Ожидается, что антитела сохраняют специфичность связывания до тех пор, пока целевой белок содержит последовательность, которая по меньшей мере на около 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более идентична любой последовательности по меньшей мере 130, 100, 80, 60, 40 или 20 смежных аминокислот в последовательности, изложенной в SEQ ID NO:89 или SEQ ID NO:90. Идентичность в

процентах определяется посредством стандартных алгоритмов выравнивания, таких как, например, средство поиска основного локального выравнивания (BLAST), описанное в Altshul et al. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410, алгоритм Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453 или алгоритм Meyers et al. (1988) *Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17.

[0046] В дополнение к последовательному анализу гомологии, картирование эпитопов (см., например, *Epitope Mapping Protocols*, ed. Morris, Humana Press, 1996) и вторичные и третичные структурные анализы могут быть выполнены для идентификации конкретных 3D-структур, предполагаемых раскрытыми антителами и их комплексы с антигенами. Такие способы включают без ограничения рентгеновскую кристаллографию (Engstrom (1974) *Biochem. Exp. Biol.*, 11:7-13) и компьютерное моделирование виртуальных представлений раскрытых в настоящее время антител (Fletterick et al. (1986) *Computer Graphics and Molecular Modeling*, в *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Производные

[0047] В настоящем раскрытии также представлен способ получения антитела, специфичного к KLRG1. CDR в таких антителах не ограничены специфичными последовательностями VH и VL, идентифицированными в таблицах 1 и 3, и могут включать варианты данных последовательностей, которые сохраняют способность специфически связываться с KLRG1. Такие варианты могут быть получены специалистом в данной области из последовательностей, перечисленных в таблицах 1 и 3, с использованием методик, хорошо известных в данной области. Например, в FR и/или в CDR могут быть выполнены замены, делеции или добавления аминокислот. В то время как изменения в FR обычно предназначены для повышения стабильности и иммуногенности антитела, изменения в CDR обычно предназначены для увеличения аффинности антитела к его мишени. Варианты FR также включают природные аллотипы иммуноглобулина. Такие повышающие аффинность изменения могут быть определены эмпирически посредством стандартных методик, которые включают изменение CDR и испытание аффинности антитела к его мишени. Например, в пределах любой из описанных CDR могут быть выполнены консервативные замены аминокислот. Различные изменения могут быть выполнены в соответствии со способами, описанными в *Antibody Engineering*, 2nd ed., Oxford University Press, ed. Borrebaeck, 1995. Они включают без ограничения нуклеотидные последовательности, которые изменены посредством замещения различных кодонов, которые функционально кодируют эквивалентный остаток аминокислоты в последовательности с получением таким образом «скрытого» изменения. Например, неполярные аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин. Отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Заместители аминокислоты в последовательности могут быть выбраны из других членов класса, к которому принадлежит аминокислота (см. таблицу 5). Кроме того, любой нативный остаток в полипептиде также может быть замещен аланином. (см., например, MacLennan et al. (1998) *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki et al. (1998) *Adv. Biophys.* 35:1-24).

Таблица 5. Иллюстративные консервативные замещения:

Остаток Консервативное замещение

Ala (A) Ser (S)

Arg (R) Lys (K)

Asn (N) Gln (Q); His (H)

Asp (D) Glu (E)

Cys (C) Ser (S)
 Gln (Q) Asn (N)
 Glu (E) Asp (D)
 Gly (G) Pro (P)
 His (H) Asn (N), Gln (Q)
 Ile (I) Leu (L), Val (V)
 Leu (L) Ile (I), Val (V)
 Lys (K) Arg (R), Gln (Q)
 Met (M) Leu (L), Ile (I)
 Phe (F) Met (M), Leu (L), Tyr (Y)
 Ser (S) Thr (T); Gly (G)
 Thr (T) Ser (S), Val (V)
 Trp (W) Tyr (Y)
 Tyr (Y) Trp (W), Phe (F)
 Val (V) Ile (I), Leu (L)
 Pro (P)—

[0048] Производные и аналоги антител по настоящему изобретению могут быть получены посредством различных способов, хорошо известными в данной области, включая рекомбинантные способы и способы синтеза (Maniatis (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. и Bodansky et al. (1995) *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin, Germany).

[0049] В одном варианте осуществления способ получения домена VH, который представляет собой вариант аминокислотной последовательности домена VH по настоящему изобретению, включает стадию добавления, делеции, замещения или вставки одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности раскрытого в настоящем изобретении домена VH, необязательно объединения домена VH, полученного таким образом, с одним или более доменами VL, и испытание домена VH или комбинации или комбинаций VH/VL в отношении специфического связывания с KLRG1 и, необязательно, испытание способности такого антигенсвязывающего домена модулировать активность KLRG1. Домен VL может иметь аминокислотную последовательность, которая идентична или является по существу такой, как изложено в таблицах 1 и 3.

[0050] Можно применять аналогичный способ, в котором один или более вариантов последовательности домена VL, раскрытого в данном документе, комбинируют с одним или более доменами VH.

[0051] В следующем аспекте настоящего раскрытия представлен способ получения антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с KLRG1. Способ включает следующее:

- (a) обеспечение начального репертуара нуклеиновых кислот, кодирующих домен VH, который либо включает заменяемый CDR3, либо лишен кодирующей области CDR3;
- (b) комбинирование репертуара с донорной нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность, по существу такую, как изложено в настоящем документе для CDR3 VH (т.е. H3), так что донорная нуклеиновая кислота вставляется в область CDR3 в репертуаре для обеспечения репертуара конечных нуклеиновых кислот, кодирующих домен VH;
- (c) экспрессирование нуклеиновых кислот конечного репертуара;
- (d) выбор связывающего фрагмента, специфичного для KLRG1; и
- (e) извлечение специфически связывающего фрагмента или кодирующей его нуклеиновой кислоты.

[0052] Кроме того, может быть использован аналогичный способ, в котором VL CDR3 (т.е. L3) по изобретению комбинируется с репертуаром нуклеиновых кислот, кодирующих домен VL, которые либо включают заменяемую CDR3, либо лишены кодирующей области CDR3. Донорная нуклеиновая кислота может быть выбрана из нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотную последовательность, по существу изложенную в SEQ ID NO:7-24 и 41-88.

[0053] Последовательность, кодирующая CDR по настоящему изобретению (например, CDR3), может быть введена в репертуар переменных доменов, в которых отсутствует соответствующий CDR (например, CDR3), с использованием технологии рекомбинантной ДНК, например, с использованием методологии, описанной в Marks et al. (Bio/Technology (1992) 10: 779-783). В частности, консенсусные праймеры, направленные на 5'-конец области переменного домена или около него, можно использовать в сочетании с консенсусными праймерами к третьей каркасной области генов VH человека для обеспечения репертуара переменных доменов VH, лишенных CDR3. Репертуар можно комбинировать с CDR3 конкретного антитела. С использованием аналогичных способов, последовательности, производные от CDR3, могут быть перетасованы с репертуарами доменов VH или VL, лишенных CDR3, и перетасованные полные домены VH или VL в сочетании с сопряженными доменами VL или VH с образованием KLRG1-специфического антитела по настоящему изобретению. Затем репертуар может быть отображен в подходящей системе-хозяине, такой как система фагового дисплея, как, например, описанная в WO92/01047, для возможности выбора подходящих антигенсвязывающих фрагментов.

[0054] Аналогичные способы перетасовки или комбинаторные способы также раскрыты в Stemmer (Nature (1994) 370: 389-391), где описана методика в отношении гена β -лактамазы, но отмечено, что данный подход можно применять для образования антител.

[0055] В дополнительных вариантах осуществления можно генерировать новые области VH или VL, несущие одну или несколько последовательностей, полученных из последовательностей, раскрытых в данном документе, с использованием случайного мутагенеза одного или более выбранных генов VH и/или VL. Одна из таких методик, подверженная ошибкам ПЦР, описана в Gram et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1992) 89: 3576-3580).

[0056] Другой способ, который можно использовать, заключается в направлении мутагенеза на CDR генов VH или VL. Такие методики раскрыты в Barbas et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1994) 91: 3809-3813) и Schier et al. (J. Mol. Biol. (1996) 263: 551-567).

[0057] Подобным образом, одна или более, или все три CDR могут быть привиты на репертуар доменов VH или VL, которые затем проверяют в отношении антигенсвязывающего фрагмента, специфичного для KLRG1.

[0058] Часть переменного домена иммуноглобулина будет содержать по меньшей мере одну из CDR, по существу такую, как изложено в настоящем документе, и необязательно промежуточные каркасные области из фрагментов scFv, как указано в настоящем документе. Данная часть может включать по меньшей мере около 50% одного или обоих FR1 и FR4, причем 50% являются С-концом, 50% FR1 и N-концом, 50% FR4. Дополнительные остатки на N-конце или С-конце существенной части переменного домена могут быть остатками, обычно не связанными с встречающимися в природе переменными областями домена. Например, конструирование антитела посредством способов рекомбинантной ДНК может привести к введению N- или С-концевых остатков, кодируемых линкерами, введенными для облегчения клонирования или других стадий манипуляции. Другие стадии манипуляции включают введение линкеров для присоединения переменных доменов к дальнейшим последовательностям белков, включая константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, другие переменные домены (например, при получении диател) или белковые метки, как более подробно обсуждается ниже.

[0059] Несмотря на то, что варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, включают «совпадающую» пару доменов VH и VL, специалисту в данной области будет понятно, что альтернативные варианты осуществления могут включать антигенсвязывающий фрагмент, содержащий только одну CDR из домена VL или VH. Любой из одноцепочечных специфически связывающихся доменов можно применять для скрининга дополнительных доменов, способных образовывать двухдоменный специфический антигенсвязывающий фрагмент, способный, например, связываться с KLRG1. Скрининг можно выполнять посредством способов скрининга фагового дисплея с использованием так называемого иерархического двойного комбинаторного подхода, раскрытого в WO92/01047, в котором отдельную колонию, содержащую клон Н или L-цепи, применяют для заражения полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), и полученный в результате домен с двухцепочечным специфическим связыванием выбирают в соответствии с описанными способами фагового дисплея.

[0060] Описанные в данном документе антитела к KLRG1 могут быть связаны с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (альбумин, другое антитело и т.д.), токсином, радиоизотопом, цитотоксическими или цитостатическими средствами. Например, антитела могут быть связаны химическим сшиванием или рекомбинантными способами. Антитела также могут быть связаны с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксипропиленами, посредством способа, изложенного в патентах США № 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; или 4,179,337. Антитела могут быть химически модифицированы посредством ковалентной конъюгации с полимером, например, для увеличения их периода полувыведения из кровотока. Иллюстративные полимеры и способы их присоединения также показаны в патентах США №№ 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285 и 4,609,546.

[0061] Раскрытые антитела также могут быть изменены для наличия паттерна гликозилирования, который отличается от нативного паттерна. Например, один или более углеводных фрагментов могут быть удалены и/или к исходному антителу могут быть добавлены один или более сайтов гликозилирования. Добавление сайтов гликозилирования к раскрытым в настоящее время антителам может осуществляться путем изменения аминокислотной последовательности для содержания согласованных последовательностей сайтов гликозилирования, известных в данной области. Другим способом увеличения количества углеводных фрагментов антитела является химическое или ферментативное связывание гликозидов с остатками аминокислоты антитела. Такие способы описаны в WO 87/05330 и в Aplin et al. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 259-306. Удаление любых углеводных фрагментов из антитела можно осуществлять химическим или ферментативным путем, например, как описано в Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 259: 52; и Edge et al. (1981) Anal. Biochem., 118: 131 и у Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol., 138: 350. Антитела также могут быть помечены детектируемой или функциональной меткой. Обнаруживаемые метки включают радиоактивные метки, такие как ¹³¹I или ⁹⁹Tc, которые также могут быть присоединены к антителам с использованием обычных химических

способов. Обнаруживаемые метки также включают ферментные метки, такие как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. Обнаруживаемые метки дополнительно включают химические фрагменты, такие как биотин, которые могут быть обнаружены посредством связывания со специфическим родственным обнаруживаемым фрагментом, например, меченым авидином.

[0062] Антитела, в которых последовательности CDR отличаются лишь незначительно от изложенных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40, входят в объем настоящего изобретения. Как правило, аминокислота заменяется родственной аминокислотой, имеющей аналогичный заряд, гидрофобные или стереохимические характеристики. Такие замены были бы в пределах обычных навыков специалиста в данной области. В отличие от CDR, в FR могут быть внесены более существенные изменения без отрицательного воздействия на связывающие свойства антитела. Изменения FR включают без ограничения гуманизацию происхождения, отличного от человеческого, или разработку определенных остатков каркаса, которые важны для контакта с антигеном или для стабилизации сайта связывания, например, изменение класса или подкласса константной области, изменение остатков специфической аминокислоты, которые могут изменять эффекторную функцию, такую как связывание рецептора Fc, например, как описано в патентах США №№ 5,624,821 и 5,648,260 и в Lund et al. (1991) J. Immun. 147: 2657-2662 и в Morgan et al. (1995) Immunology 86: 319-324, или изменение вида, от которого происходит константная область.

[0063] Специалисту в данной области будет понятно, что модификации, описанные выше, не являются исчерпывающими и что многие другие модификации будут очевидны для специалиста в данной области в свете принципов настоящего раскрытия.

Нуклеиновые кислоты, системы клонирования и экспрессии

[0064] В настоящем раскрытии также представлены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие раскрытые антитела. Нуклеиновые кислоты могут содержать ДНК или РНК и могут быть полностью или частично синтетическими или рекомбинантными. Упоминание нуклеотидной последовательности, как изложено в данном документе, охватывает молекулу ДНК с указанной последовательностью, и охватывает молекулу РНК с указанной последовательностью, в которой U заменен на T, если в контексте не предусмотрено иное.

[0065] Нуклеиновые кислоты, представленные в данном документе, содержат кодирующую последовательность для CDR, доменов VH и/или доменов VL, раскрытых в данном документе.

[0066] В настоящем раскрытии также представлены конструкции в форме плазмид, векторов, фагмид, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую CDR, доменов VH и/или доменов VL, описанные в данном документе.

[0067] В настоящем раскрытии также представлена клетка-хозяин, которая содержит одну или более конструкций, указанных выше.

[0068] Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую CDR (H1, H2, H3, L1, L2 или L3), домены VH или VL, а также способы получения кодированных продуктов. Способ включает экспрессию кодируемого продукта кодирующей нуклеиновой кислоты. Экспрессия может быть достигнута посредством культивирования в соответствующих условиях рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту. После получения посредством экспрессии домена VH или VL или специфического связывающего

члена можно выделить и/или очистить с использованием любой подходящей методики, а затем использовать по мере необходимости.

[0069] Антигенсвязывающий фрагменты, домены VH и/или VL и кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты и векторы могут быть выделены и/или очищены от их естественного окружения в по существу чистой или гомогенной форме, или, в случае нуклеиновой кислоты, не содержащей или по существу не содержащей нуклеиновую кислоту или гены происхождения, отличных от последовательности, кодирующей полипептид с требуемой функцией.

[0070] Системы для клонирования и экспрессии полипептида в различных клетках-хозяевах хорошо известны в данной области. Информацию о клетках, подходящих для получения антител, см. в *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999. Вкратце, подходящие клетки-хозяева включают бактерии, растительные клетки, клетки млекопитающих, дрожжевые и бакуловирусные системы. Клеточные линии млекопитающих, доступные в данной области для экспрессии гетерологичного полипептида, включают клетки яичников китайского хомячка, клетки HeLa, клетки почек детенышей хомячка, клетки миеломы мыши NS0 и многие другие. Обычным бактериальным хозяином является *E. coli*. Для получения раскрытых антител можно применять любую систему экспрессии белка, совместимую с изобретением. Подходящие системы экспрессии включают трансгенных животных, описанных в *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Фернандес et al., 1999.

[0071] Подходящие векторы могут быть выбраны или сконструированы таким образом, чтобы они содержали подходящие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, терминаторные последовательности, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности, если это необходимо. Векторы могут представлять собой плазмиды или вирусы, например, фаг или фагмиду, в зависимости от ситуации. Подробнее см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Многие известные способы и протоколы для манипуляции с нуклеиновой кислотой, например, при получении конструкций нуклеиновой кислоты, мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и экспрессии генов, и анализ белков, подробно описаны в *Current Protocols in Molecular Biology*, 2nd Edition, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992.

[0072] В следующем аспекте настоящего раскрытия представлена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе. В еще одном аспекте представлен способ, включающий введение такой нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Во введении можно использовать любую доступную методику. Для эукариотических клеток подходящие способы могут включать трансфекцию фосфатом кальция, DEAE-декстран, электропорацию, трансфекцию, опосредованную липосомами, и трансдукцию с использованием ретровируса или другого вируса, например, коровьей оспы или, для клеток насекомых, бакуловируса. Для бактериальных клеток подходящие способы могут включать трансформацию хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофага. Введение нуклеиновой кислоты в клетки может сопровождаться обуславливанием или обеспечением экспрессии нуклеиновой кислоты, например, посредством культивирования клеток-хозяев в условиях для экспрессии гена.

Способы применения

[0073] Раскрытые антитела к KLRG1 способны модулировать KLRG1-ассоциированную модуляцию иммунных ответов. В конкретных вариантах осуществления активация цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров опосредуется модуляцией передачи сигналов KLRG1. Раскрытые антитела могут выступать либо в качестве агонистов, либо антагонистов KLRG1 в зависимости от способа их применения. Антитела можно применять для предупреждения, диагностики или лечения заболеваний у млекопитающих, в частности, у людей. Антитела по настоящему изобретению также можно применять для выделения клеток, экспрессирующих KLRG1 или KLRG1. Кроме того, антитела

можно применять для лечения субъекта с риском или предрасположенностью к заболеванию или имеющего расстройство, связанное с aberrантной экспрессией или функцией KLRG1.

[0074] Антитела по настоящему изобретению можно применять в случаях, когда может быть желательна модуляция цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров, например, при некоторых типах рака и инфекционных заболеваниях.

[0075] Если необходима пониженная активация лимфоцитов, антитела к KLRG1 по настоящему изобретению можно применять в качестве агонистов к KLRG1 для усиления KLRG1-ассоциированного ослабления активации цитотоксических (или CD8+) Т-клеток и естественных клеток-киллеров.

[0076] При определенных условиях может быть необходимо вызвать или усилить иммунный ответ пациента для лечения рака или инфекционного заболевания. Расстройства, которые излечивают или предупреждают посредством описанных способов, включают без ограничения инфекции, вызываемые микробами (например, бактериями), вирусами (например, системные вирусные инфекции, такие как грипп, вирусные кожные заболевания, такие как герпес или опоясывающий лишай) или паразитами; и рак (например, меланому и рак простаты).

[0077] Активация цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров антителами к KLRG1 усиливает ответы Т-клеток и естественных клеток-киллеров. В таких случаях антитела выступают в качестве антагонистов KLRG1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитела можно использовать для ингибирования или снижения подавляющей активности, связанной с KLRG1, то есть активности, связанной с подавлением активации цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров. Как показано в примерах, блокада взаимодействия KLRG1/Е-кадгерина с антагонистическими антителами к KLRG1 приводит к усилению пролиферативных ответов Т-клеток и секреции IFN γ данными клетками, что согласуется с подавляющей ролью пути KLRG1 в активации цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров. В различных вариантах осуществления антитела ингибируют связывание Е-кадгерина с KLRG1 при IC50 менее около 50 нМ и более предпочтительно менее около 40, 30, 20, 10 или 5 нМ. Ингибирование связывания Е-кадгерин можно измерить, как описано в примере 6, или с использованием способов, известных в данной области.

[0078] Антитела или композиции антитела по настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективных количествах. Как правило, терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от возраста, состояния и пола субъекта, а также от тяжести медицинского состояния субъекта. Терапевтически эффективное количество антитела находится в диапазоне от около 0,001 до около 30 мг/кг веса тела, предпочтительно от около 0,01 до около 25 мг/кг веса тела, от 0,1 до около 20 мг/кг веса тела или от около 1 до около 10 мг/кг. При необходимости дозировку можно скорректировать в соответствии с наблюдаемыми эффектами лечения. Соответствующую дозу выбирает лечащий врач на основании клинических показаний.

[0079] Антитела можно вводить в виде болюсной дозы для максимизации уровней антитела в кровотоке в течение максимального периода времени после введения дозы. После болюсной дозы также можно применять непрерывную инфузию.

[0080] Иммунные клетки (например, Т-клетки или естественные клетки-киллеры) также могут быть выделены от пациента и культивированы *ex vivo* с антителами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления активация Т-клеток и естественных клеток-киллеров может быть модулирована посредством удаления иммунных клеток у субъекта, приведения в контакт с иммунными клетками *in vitro* с антителом к KLRG1 по настоящему изобретению). В таких вариантах осуществления антитело к KLRG1 можно применять в мультивалентной форме, так что молекулы KLRG1 на поверхности иммунной клетки становятся «сшитыми» при связывании с такими антителами. Например, антитела к KLRG1 могут быть связаны с твердой подложкой, такой как гранулы, или сшиты посредством

вторичного антитела. Затем иммунные клетки могут быть выделены с использованием способов, известных в данной области, и повторно имплантированы пациенту.

[0081] В другом аспекте антитела по настоящему изобретению можно применять в качестве нацеливающего средства для доставки другого терапевтического средства или цитотоксического средства (например, токсина) в клетку, экспрессирующую KLRG1. Способ включает введение антитела против KLRG1, связанного с терапевтическим или цитотоксическим средством, или в условиях, которые позволяют связываться с антителом к KLRG1.

[0082] Антитела по настоящему изобретению также можно применять для обнаружения присутствия KLRG1 в биологических образцах. Количество обнаруженного KLRG1 может коррелировать с уровнем экспрессии KLRG1, который, в свою очередь, коррелирует со статусом активации иммунных клеток (например, активированных Т-клеток или естественных клеток-киллеров) у субъекта.

[0083] Способы обнаружения, в которых применяются антитела, хорошо известны в данной области и включают, например, ELISA, радиоиммуноанализ, иммуноблоттинг, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценцию, иммунопреципитацию. Антитела могут быть предоставлены в диагностическом наборе, который включает один или несколько из данных способов для обнаружения KLRG1. Такой набор может содержать другие компоненты, упаковку, инструкции или другой материал для облегчения обнаружения белка.

[0084] Если антитела предназначены для диагностических целей, может быть необходима их модификация, например, с помощью группы лиганда (такой как биотин) или обнаруживаемой маркерной группы (такой как флуоресцентная группа, радиоизотоп или фермент). При необходимости, антитела по настоящему изобретению могут быть мечены с использованием обычных методик. Подходящие детектируемые метки включают, например, флуорофоры, хромофоры, радиоактивные атомы, электронно-плотные реагенты, ферменты и лиганды, имеющие партнеров по специфическому связыванию. Ферменты обычно обнаруживаются по их активности. Например, пероксидазу хрена можно определить по ее способности превращать тетраметилбензидин (ТМБ) в синий пигмент, количественно определяемую с помощью спектрофотометра. Для обнаружения подходящие партнеры связывания включают без ограничения биотин и авидин или стрептавидин, IgG и белок А и многочисленные пары рецептор-лиганд, известные в данной области. Другие варианты и возможности будут очевидны для специалистов в данной области и рассматриваются как эквиваленты в пределах объема настоящего изобретения.

[0085] Антитела по настоящему изобретению можно применять в способах скрининга для выявления ингибиторов пути KLRG1, эффективных в качестве терапевтических средств. В таком скрининговом анализе первую связывающую смесь формируют посредством объединения KLRG1 и антитела по настоящему изобретению; и измеряют количество связывания в первой связывающей смеси (M0). Вторую связывающую смесь также формируют посредством объединения KLRG1, антитела и соединения или средства, подлежащего скринингу, и измеряют количество связывания во второй связывающей смеси (M1). Испытываемое соединение может представлять собой другое антитело к KLRG1, как показано в примерах. Затем сравнивают количества связывания в первой и второй связывающих смесях, например, посредством вычисления отношения M1/M0. Считается, что соединение или средство способны модулировать связанное с KLRG1 подавление иммунных ответов, если наблюдается снижение связывания во второй связывающей смеси по сравнению с первой связывающей смесью. Состав и оптимизация связывающих смесей находится в пределах компетенции специалиста в данной области, такие связывающие смеси могут также содержать буферы и соли, необходимые для усиления или оптимизации связывания, и в скрининговый анализ по настоящему изобретению могут быть включены дополнительные контрольные анализы. Таким образом, можно идентифицировать соединения, снижающие связывание KLRG1 с антителами менее чем на 10% (т.е. $M1/M0 < 0,9$), предпочтительно более чем на 30%, а затем, при необходимости, может быть проведен вторичный скрининг на способность улучшать нарушение в других анализах или на животных моделях, как описано

ниже. Сила связывания между KLRG1 и антителом может быть измерена с использованием, например, иммуноадсорбционного анализа с ферментной связью (ELISA), радиоиммуноанализа (RIA), технологии на основе поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore), все из которых представляют собой способы, хорошо известные в данной области.

[0086] Затем соединение можно тестировать *in vitro*, как описано в примерах, или в животной модели. Предварительные дозы, такие как, например, определяемые в соответствии с испытаниями на животных, и масштабирование доз для введения человеку выполняют в соответствии с принятыми в данной области практиками. Токсичность и терапевтическую эффективность можно определить посредством стандартных фармацевтических процедура на культурах клеток или экспериментальных животных. Данные, полученные из анализов клеточных культур или исследований на животных, можно применять для определения диапазона доз для применения у людей. Терапевтически эффективные дозы, достигнутые на одной животной модели, могут быть преобразованы для применения на другом животном, включая людей, с использованием коэффициентов преобразования, известных в данной области (см., например, Freireich et al. (1966) *Cancer Chemother. Reports*, 50(4): 219-244).

Фармацевтические композиции и способы введения

[0087] В настоящем раскрытии представлены композиции, содержащие антитела к KLRG1. Такие композиции могут быть подходящими для фармацевтического применения и введения пациентам. Композиции обычно содержат один или более антител по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Выражение «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные средства, противогрибковые средства, изотонические средства, средства, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые совместимы с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. Композиции могут также содержать другие активные соединения, обеспечивающие вспомогательные, дополнительные или усиленные терапевтические функции. Фармацевтические композиции также могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями для введения.

[0088] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению составлена таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым способом введения. Способы выполнения введения известны специалистам в данной области. Введение может быть, например, внутривенным, внутривентральным, внутримышечным, внутримолочным, подкожным или чрескожным. Также могут быть получены композиции, которые можно вводить наружно или перорально или которые могут передаваться через слизистые оболочки.

[0089] Растворы или суспензии, применяемые для внутрикожного или подкожного применения, обычно включают один или более из следующих компонентов: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Такие препараты могут быть заключены в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для нескольких доз, выполненные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного получения стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL (BASF,

Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить посредством шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия таких микроорганизмов, как бактерии и грибки. Профилактика действия микроорганизмов может быть достигнута посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические средства, например, сахара; многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и/или посредством применения поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0090] Композиции для перорального введения обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Их можно заключать в желатиновые капсулы или прессовать в таблетки. Для перорального применения антитела можно комбинировать со вспомогательными веществами и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Фармацевтически совместимые связывающие средства и/или вспомогательные материалы могут быть включены в виде части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений аналогичной природы; связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее средство, такое как стеарат магния или Sterotes; вещество, способствующее скольжению, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

[0091] Системное введение также может осуществляться через слизистые оболочки или через кожу. Для трансмукозального или чрескожного введения в составе применяют смачивающие средства, подходящие для проницаемого барьера. Такие смачивающие средства обычно известны в данной области и включают, например, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмуккозальное введение можно осуществлять, например, посредством пастилок, назальных спреев, ингаляторов или суппозиторий; например, в случае антител, которые содержат часть Fc, композиции могут быть способны проникать через слизистые оболочки в кишечнике, рту или легких (например, посредством пути, опосредованного рецептором FcRn, как описано в патенте США № 6030613). Для чрескожного введения активные соединения могут быть получены в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, обычно известных в данной области. Для введения посредством ингаляции антитела могут доставляться в форме аэрозольного спрея из контейнера или дозатора под давлением, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или распылитель.

[0092] В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе антитела получают с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут очевидны специалистам в данной области. Также в качестве фармацевтически приемлемых носителей можно применять липосомные суспензии, содержащие описанные в данном документе антитела. Они могут быть получены посредством способов, известных специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

[0093] Может быть предпочтительно составлять композиции для перорального или парентерального введения в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Термин «единичная лекарственная форма», применяемый в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное на достижение необходимого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

[0094] Токсичность и терапевтическую эффективность композиции по настоящему изобретению можно определить посредством стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (летальной дозы для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено в виде отношения LD50/ED50. Композиции, которые демонстрируют большие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

[0095] Для любой композиции, применяемой в соответствии с настоящим изобретением, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить посредством анализов на культуре клеток. Примеры подходящих биологических анализов включают анализы репликации ДНК, анализы высвобождения цитокинов, анализы на основе транскрипции, анализы связывания KLRG1/кадгерин, иммунологические анализы и другие анализы, как, например, описанные в примерах. Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, можно применять для определения диапазона доз для применения у людей. Дозу можно составить на животных моделях для достижения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, который включает IC50 (т.е. концентрацию антитела, которая обеспечивает половинное подавление симптомов). Уровни циркуляции в плазме можно измерить, например, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Эффекты любой конкретной дозировки можно контролировать посредством подходящего биоанализа. Дозировка предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьировать в зависимости от применяемой лекарственной формы и применяемого способа введения.

[0096] Следующие ниже примеры никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения. Специалист в данной области распознает многочисленные модификации и вариации, которые могут быть выполнены без изменения сущности или объема настоящего изобретения. Такие модификации и вариации входят в объем настоящего изобретения. Полное содержание всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патент, упомянутых в данной заявке, включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение рекомбинантных белков

[0097] Рекомбинантные белки получали посредством стандартного молекулярного клонирования, при этом протоколы экспрессии включают ECD KLRG1 человека (SEQ ID NO: 89), ECD KLRG1 яванского макака (SEQ ID NO: 90) и E-кадгерин человека (SEQ ID NO: 91), аминокислотные последовательности которых показаны ниже в таблице 6. Рекомбинантные белки получали в виде слияния FC или версий с меткой HIS путем клонирования соответствующей кДНК в вектор pCDNA4 (Invitrogen) и временной трансфекции в HEK293 млекопитающих. Очистку экспрессированных белков осуществляли посредством хроматографии с использованием аффинной смолы с белком А для гибридных версий FC и смолы никель-NTA для белков, меченных HIS. Все очищенные белки характеризовали электрофорезом в SDS-PAGE для проверки чистоты и молекулярной массы.

Таблица 6. Аминокислотные последовательности ECD KLRG1 человека и яванского макака и человеческого E-кадгерина

SEQ ID NO. Белок Аминокислотная последовательность

SEQ ID NO:89 ECD KLRG1 человека
 LCQGSNYSTCASCPCSPDRWMKYGNHCYYFSVEEKDWNSSLEFCLARDSHLLVITDNQE
 MSLQVFLSEAFWCWIGLRNNSGWRWEDGSPLNFSRISSNSFVQTCGAINKNGLQASSCEVPLHW
 VCKKVRL

SEQ ID NO:90 ECD KLRG1 яванского макака
 LCQGSKYSTCASCPCSPDHWMKYGNHCYYFSVEKKDWISSLEFCLARDSHLLMITDKQE
 MSLQDQDFLSEAFHWWGLRNNSGWRWEDGSPLNFSRIYSNSLVQTCGAINKNSLQASSCEVSLQW
 VCKKVSP

SEQ ID NO:91 E-кадгерин человека
 DWVIPPISCPENEKGFPPKNLVQIKSNKDKEGKVFYSITGQGADTPPVGVFIERETGWLVK
 TEPLDRERIATYTLFSAVSSNGNAVEDPMEILITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEGALPGTSVM
 EVTATDADDDVNTYNAIAIYILSQDPELPDKNMFTINRNTGVISVTTGLDRESFPTYTLVVQAAD
 LQGEGLSTTATAVITVTDNDNPPIFNPTTYKGQVPENANVVITTLKVTADAPNTPAWEAVYIL
 NDDGGQFVVTNPVNDGILKTAKGLDFEAKQYILHVAVTNVVPEVSLTTSTATVTVDVLDVNE
 APIFVPEKRVEVSEDFGVGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRDTANWLEINPDTGAISTRAELD
 REDFEHVKNSTYALIIATDNGSPVATGTGTLILLSDVNDNAPIPEPRTIFFCERNPKPQVINIIDADL
 PPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESIILKPKMALEVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVS
 CDCEGAAGVCRKAQPVEAGLQIPAILGILGGILALLILLLLLLFLRRRAVVKEPLLPEDDTRDNVYY
 YDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPRYLPRPANPDEIGNFIDENLKAAD
 TDPTAPPYDSSLVFDYEGSGSEAASSLNSESSEDKDQDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD

[0098] Стабильные клеточные линии разрабатывали для применения в качестве иммунизационных антигенов для тестирования связывания антител с полноразмерным антигеном и в качестве клеток-мишеней в функциональных анализах Т-клеток. Разработанные клеточные линии включают CHO, экспрессирующую полноразмерный KLRG1 человека, и CHO, экспрессирующую полноразмерный KLRG1 яванского макака. Стабильные клеточные линии получали путем трансфекции клеток CHO с помощью представляющего интерес белка, кодирующего плазмиду pCDNA4. После трансфекции клетки подвергали воздействию 500 мкг/мл G418 для отбора стабильно интегрированной плазмиды. Клеточные линии дополнительно характеризовали посредством FACS в отношении экспрессии и сортировали для отбора на гомогенную и стабильную экспрессию.

[0099] Стабильные клетки CHO, дважды трансфицированные агонистом CD3 и E-кадгеринном, применяли в функциональных анализах для демонстрации эффекта блокады KLRG1 человеческих Т-клеток. Совместную экспрессию агониста CD3 и E-кадгерина подтверждали с помощью 2-цветной FACS с соответствующими антителами.

Пример 2. Образование антител к KLRG1

[0100] Антитела ABC_HG1N01, ABC_HG1N02 и ABC_HG1N07 представляют собой гуманизированные антитела IgG1 против внеклеточного домена KLRG1. Мышиные моноклональные антитела (MAB) против человеческого KLRG1 получали посредством стандартных иммунизаций самок мышей BALB/c и мышей SJL с KLRG1 человека и яванского макака и последующим скринингом гибридом. Применяли несколько стратегий иммунизации для создания различного числа совпадений антител. Вкратце, мышей SJL и Balb/c повторно иммунизировали либо с помощью кДНК, либо рекомбинантным антигеном, либо клетками CHO, экспрессирующими интересующий антиген. Титры антигенспецифических антител периодически контролировали с помощью ELISA, и животных умерщвляли при достижении соответствующих титров, обычно между коэффициентом разведения 1:1000 и 1:10000. Спленциты умерщвленных мышей сливали с клетками миеломы мышей для получения клеток гибридомы, а затем культивировали и субклонировали в отдельные клетки.

Стабильные клоны масштабировали, среду собирали и испытывали в отношении экспрессии антитела к KLRG1 с помощью ELISA и FACS.

Пример 3. Выбор блокирующих антител к KLRG1

[0101] Гибридомы, продуцировавшие антитела, подвергали скринингу на связывание с ECD KLRG1 человека и ECD KRG1 яванского макака. Антитела с перекрестной реактивностью между обоими антигенами выбирали для перехода к следующей стадии скрининга для определения их способности нейтрализовать взаимодействие между KLRG1 и E-кадгерином. Антитела ранжировали в соответствии с их связыванием EC50 с KLRG1 человека и яванского макака и дополнительно определяли приоритет в соответствии с их IC50 в конкурентном анализе E-кадгерина. Согласно данным критериям отобрали всего 48 антител. Восемь антител были приоритетными для функциональной характеристики в клеточном анализе. В таблице 3 приведены аминокислотные последовательности вариабельной области 8 выбранных мышинных антител, а в таблице 4 показаны области CDR для 8 выбранных мышинных антител. Далее антитела ранжировали в соответствии с наличием мотивов последовательной пассивности, приведенных в таблице 7. В CDR-L1 ABC_G1N01 и ABC_G1N02 был обнаружен сайт дезамидирования (NG), который мог влиять на стабильность при производстве и активность лекарственного вещества. Для устранения данной потенциальной опасности конструировали и испытывали серию мутантов. В частности, мотив NG может быть заменен последовательностями NA, QG и KG без петель связывания. Мышинные антитела могут быть гуманизированы путем прививания участков CDR на человеческий каркас. В таблице 1 приведены примеры последовательностей вариабельной области гуманизированных конструкций для ABC_G1N01 (ABC_HG1N01), ABC_G1N02 (ABC_HG1N02) и ABC_G1N07 (ABC_HG1N07). Кроме того, в области CDR могут быть внесены консервативные мутации для улучшения аффинности, активности или биофизических характеристик. В таблице 5 приведен список консервативных мутаций, которые могут быть внесены в области CDR. Эпитопы моноклональных антител сортировали в соответствии с их способностью конкурировать друг с другом. Было обнаружено, что антитела могут быть сгруппированы в 3 различные группы; BIN1 включает следующие: ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05. BIN2 включает следующие: MAB25, MAB031. BIN3 включает следующие: ABC_G1N07, ABC_G1N08. Антитела получали в виде химерных антител путем клонирования вариабельных областей мыши на константные каркасные области человеческого IgG и исследовали в функциональных анализах для определения их функциональной активности в отношении человеческих Т-клеток и описанных в данном документе.

Таблица 7. Лабильные мотивы последовательностей, применяемые для скрининга антитела в отношении потенциальных проблем при производстве

Лабильный мотив вследствие

неспаренного цистеина С Образование аддукта, потеря активности, запутывание, агрегация, неустойчивость процесса

Дезамидирование NG Потеря активности, агрегирование, неустойчивость процесса

N-гликозилирование NXS/T, X не является P Влияние на PK при сильном сиалилировании, потеря активности

Сульфатирование тирозина Neg-Neg-Y-Neg-Neg Потеря активности, неустойчивость процесса

Гидролиз Asp-Pro DP Фрагментация, стабильность

Окисление метионина M Потеря активности, агрегирование

Окисление триптофана W Фоточувствительность, потеря активности

Дезамидирование NS, QG, NN Потеря активности, агрегирование, неустойчивость процесса

Изомеризация аспартата DG, DS, DQ, DK Потеря активности, агрегирование

Пример 4. Определение характеристики связывания антитела с KLRG1 (EC50) и ингибирования и взаимодействия KLRG1/Е-кадгерин посредством FACS (IC50)

[0102] Связывание моноклональных антител к KLRG1 с клетками, экспрессирующими KLRG1 человека и яванского макака, осуществляли посредством FACS. Клетки яичника китайского хомячка (CHO) стабильно трансфицировали для экспрессии полноразмерных KLRG1 человека (CHO-human-KLRG1) и KLRG1 яванского макака (CHO-cynomolgus-KLRG1). Значения EC50 определяли путем инкубации различных концентраций моноклональных антител к KLRG1 в диапазоне концентраций от 1 до 100 нМ и измерения флуоресценции меченых клеток с использованием выявляющего антитела к антителу мыши, непосредственно конъюгированного с флуоресцентным зондом.

[0103] Способность моноклональных антител ингибировать связывание Е-кадгерин/KLRG1 измеряли посредством FACS. Связывание Е-кадгерина с клетками CHO-hKLRG1 сначала определяли путем инкубации клеток, экспрессирующих KLRG1, с различной концентрацией HIS-меченного рекомбинантного Е-кадгерина и выявляли посредством FACS с выявляющим антителом к HIS. EC50 взаимодействия Е-кадгерин/KLRG1, определенная посредством данного способа, составляла 1 мкМ. Значения IC50 для каждого моноклонального антитела определяли посредством мониторинга потери связывания Е-кадгерина в зависимости от изменения концентрации моноклональных антител от 0,1 до 100 нМ. Значения EC50 и IC50 рассчитаны с использованием программного обеспечения SigmaPlot и приведены в таблице 8.

Таблица 8. EC50 связывания и IC50 ингибирования Е-кадгерина для МАВ, измеренные посредством FACS.

ID антитела	Связывание EC50 (нМ)		Ингибирование Е-кадгерина IC50 (нМ)
	KLRG1 человека	KLRG1 яванского макака	
ABC_G1N01	1,21	1,45	12,2
ABC_G1N02	1,01	2,02	5,03
ABC_G1N03	1,3	1,06	NA
ABC_G1N04	29,0	0,47	NA
ABC_G1N05	39,8	0,5	23
ABC_G1N06	1,43	1,5	41
MAV031	5,1	5,93	39
ABC_G1N07	0,94	0,98	9,6
ABC_G1N08	4,8	1,3	10

Пример 5. Измерение кинетики связывания

[0104] Кинетику связывания гуманизированных антител KLRG1 человека и яванского макака определяли посредством измерения OCTET®. В системах OCTET® применяется технология биослойной интерферометрии (Bio-Layer Interferometry, BLI) для мониторинга связывания белков и других биомолекул со своими партнерами непосредственно в реальном времени с получением анализа кинетических констант связывания. См. <https://www.fortebio.com/bli-technology.html>, содержание которой, включая все связанные с ней ссылки и подссылки, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Экспериментальная система включает иммобилизацию биотинилированного рекомбинантного антигена (Human-KLRG-ECD или cynomolgus-KLRG1-ECD) на датчике со стрептавидином OCTET® для получения датчиков, нагруженных антигеном. Нагруженные датчики подвергают воздействию различных концентраций каждого гуманизированного антитела от 100 до 0,1 нМ на приборах OCTET®, и данные собирают в течение 600 секунд для измерения кинетики ассоциации (K_{on}) комплекса антитело/антиген. На следующей стадии датчики подвергают 1 X воздействию фосфатно-солевого буфера (PBS), не содержащего антитело, в течение 600 секунд для наблюдения кинетики диссоциации (K_{off}). Затем полученные данные подбирают по модели кинетики связывания 1:1 с использованием аналитического программного обеспечения ForteBio® для расчета KD. Параметры кинетического связывания, полученные посредством данного способа, приведены в таблице 9 для трех гуманизированных антител.

Таблица 9. Аффинность связывания выбранных MAB, измеренная посредством OCTET®

Антиген	Антитело	K_{on} (1/мс)	K_{off} (1/с)	KD (M)
KLRG1 человека	ABC_G1N01	2,29E+06	2,87E-04	1,25E-10
	ABC_G1N02	2,80E+06	6,81E-04	2,43E-10
	ABC_G1N07	1,97E+06	Менее 1,0E-05	Менее 5,1E-12
KLRG1 яванского макака	ABC_G1N01	6,64E+05	4,10E-05	6,17E-11
	ABC_G1N02	6,30E+05	4,07E-05	6,47E-11
	ABC_G1N07	8,80E+05	1,25E-03	1,42E-09

Пример 6. Определение характеристик функциональной активности антител, блокирующих KLRG1

[0105] Блокирование взаимодействия KLRG1 с его лигандами оказывает активирующее действие на CD8+ Т-клетки человека определяют путем измерения влияния опосредованной антителами блокады передачи сигналов KLRG1 на выработку IFN γ и на пролиферацию Т-клеток (индекс пролиферации). Для демонстрации влияния блокады KLRG1 на клетки иммунной системы CD8+ Т-клетки выделяли у здоровых доноров и испытывали в совместном культивировании с клеточной линией CHO, коэкспрессирующей агонист CD3 и Е-кадгерин (eAPC). Анализ осуществляют посредством получения Т-клеток с 2 конкурирующими сигналами, причем стимуляции CD3 противодействует ингибирующему эффекту Е-кадгерина. Если передача сигнала KLRG1 блокируется антителами к KLRG1, ингибирующий сигнал нарушается, и Т-клетки активируются в соответствии с их взаимодействием с агонистом CD3, экспрессируемым на поверхности клетки. Секрецию IFN γ измеряют посредством ELISA, и результаты приведены в таблице 10 и на ФИГ. 1.

Таблица 10. Восстановление высвобождения IFN γ блокирующими KLRG1 антителами в человеческих CD8 $^+$ Т-клетках

Высвобожденный IFN γ (пг/мл)		
	Образец 1	Образец 2
Положительный контроль CD8	1624,09	1401,42
Изотип	390,02	355,94
ABC_G1N07	1579,71	1389,6
ABC_G1N02	1440,87	1290,52
ABC_G1N01	1185,14	1217,73
ABC_G1N06	1023,15	1142,09
ABC_G1N05	1012,46	1083,04
ABC_G1N08	1013,8	1063,23
ABC_G1N04	987,48	1002,46
ABC_G1N03	934,34	868,9

[0106] Представленные данные демонстрируют, что Е-кадгерин оказывает ингибирующее действие на человеческие Т-клетки, которое может быть обращено блокадой передачи сигналов KLRG1 посредством блокирующих антител.

[0107] Данные, представленные в таблице 11 и на ФИГ. 2, демонстрируют, что блокирование взаимодействия KLRG1/Е-кадгерин приводит к пролиферации человеческих CD8 $^+$ Т-клеток путем измерения индекса пролиферации в ответ на еАРС. В данном анализе еАРС получали путем стабильной трансдукции клеток СНО с помощью ч-Екадгерина и средства-агониста CD3. Затем полученную таким образом еАРС совместно инкубировали в течение 3 дней со свежeweделенными CD8 $^+$ Т-клетками здорового добровольца в присутствии 10 мкг/мл исследуемых антител или изотипического контроля. Образец положительного контроля получали путем инкубации CD8 $^+$ Т-клеток с клетками СНО, стабильно экспрессирующими антитело к CD3, но не имеющими экспрессии ингибирующего лиганда Е-кадгерина, что, таким образом, позволяло не ингибировать стимуляцию CD8 $^+$ Т-клеток антителом к CD3, экспрессируемом на клетках СНО. Результаты показывают, что CD8 $^+$ Т-клетки пролиферируют в ответ на стимуляцию CD3, как и ожидалось, и что совместная экспрессия ингибирующего лиганда Е-кадгерина на еАРС ингибирует пролиферацию CD8 $^+$ Т-клеток. Кроме того, пролиферация CD8 $^+$ Т-клеток может быть восстановлена блокадой KLRG1 нейтрализующими антителами.

Таблица 11. Влияние блокады KLRG1 на пролиферацию CD8 $^+$ Т-клеток

Коэффициент деления		
Положительный контроль	0,214	0,229
Изотип	0,139	0,121
ABC_G1N07	0,252	0,235

ABC_G1N02 0,25 0,236

[0108] Данные, представленные в таблице 12 и на ФИГ. 3, показывают корреляцию между активностью Т-клеток в анализе секреции IFN γ и блокирующей активностью нейтрализующих антител к KLRG1. Значения IC50 для каждого антитела получали из исследований ингибирования связывания Е-кадгерина и наносили на график в зависимости от уровней выработки IFN γ , измеренных в анализах высвобождения IFN γ CD8+ Т-клетками. Корреляция показывает, что антитела с более низкими значениями IC50 (например, более сильные блокаторы связывания KLRG1/Е-кадгерин) обеспечивают более высокие уровни высвобождения IFN γ CD8+ Т-клетками. Представленные данные демонстрируют, что блокада KLRG1 антителами приводит к восстановлению активности Т-клеток от Е-кадгерина образом.

Таблица 12. Корреляция между конкурентными значениями IC50 для Е-кадгерина и секрецией IFN γ

mAb	IFN γ (пг/мл)	IC50 (нМ)
ABC_G1N07	1512,76	4,21
ABC_G1N02	1484,66	9,6
ABC_G1N01	1365,75	
MAV034	1201,44	11,2
MAV024	1129,8	15,4
ABC_G1N05	1082,62	12,3
ABC_G1N08	1047,75	23
MAV036	1038,52	10
MAV031	975,34	18
Изотип	799,27	39

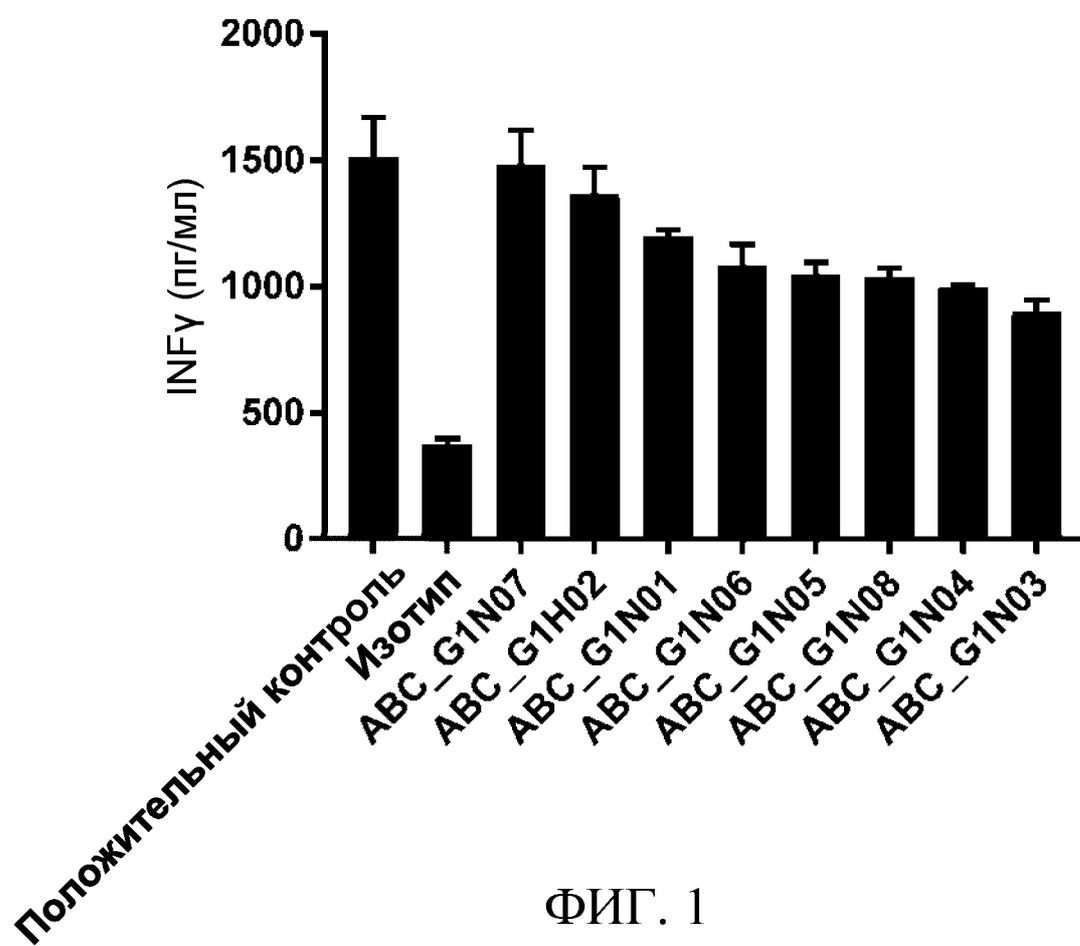
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Формула изобретения

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79 или SEQ ID NO:85.
2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с внеклеточным доменом члена 1 подсемейства G лектиноподобных рецепторов клеток-киллеров (KLRG1) человека и внеклеточным доменом KLRG1 яванского макака.
3. Антитело по п. 1, содержащее аминокислотную последовательность, по существу изложенную в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40.
4. Антитело по п. 1, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 и SEQ ID NO:40.
5. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что антитело специфически связывается с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична любой последовательности по меньшей мере из 100 смежных аминокислот по меньшей мере одной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:89 и SEQ ID NO:90.
6. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что антитело специфически связывается с внеклеточным доменом KLRG1 с аффинностью, выраженной в KD, по меньшей мере около 2 нМ, около 1 нМ, около 100 пМ, около 10 пМ или около 5 пМ.
7. Антитело по п. 5, причем антитело ингибирует связывание E-кадгерина с KLRG1 при IC50 менее чем около 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ или 10 нМ.
8. Антитело по п. 1, причем антитело является гуманизированным.
9. Антитело по п. 1, причем антитело представляет собой IgG1 или IgG4.
10. Антитело по п. 9, причем антитело представляет собой IgG1 λ или IgG1 κ .
11. Антитело по п. 1, причем антитело представляет собой ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 или ABC_G1N08.
12. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.
13. Способ лечения, включающий введение эффективной дозы фармацевтической композиции по п. 12.
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят субъекту, нуждающемуся в лечении или предупреждении рака или инфекционного заболевания.
15. Способ по п. 13, в котором субъект является человеком.

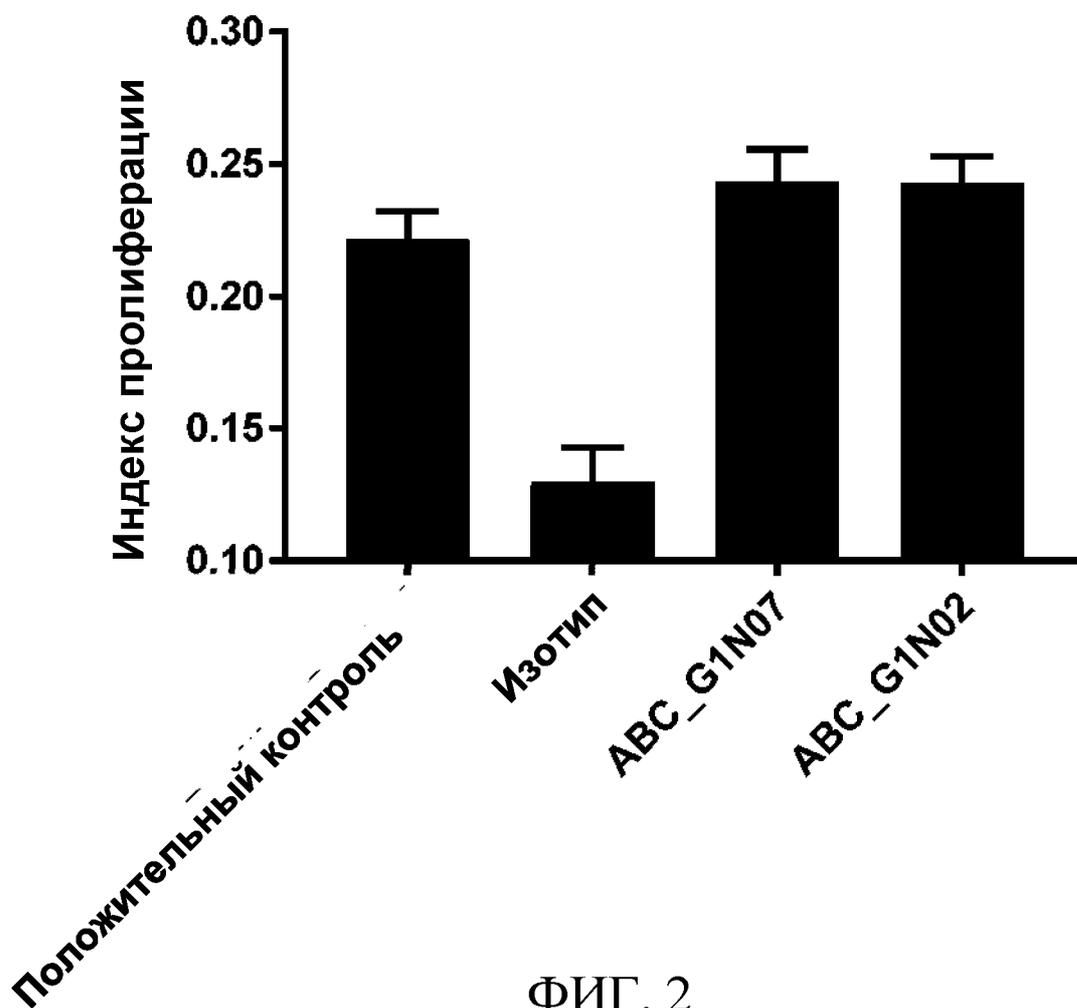
16. Антитело, содержащее человеческие каркасные области, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с KLRG1, и при этом антитело способно блокировать связывание между KLRG1 человека или яванского макака и E-кадгерином.
17. Антитело по п. 16, причем указанное антитело содержит CDR, образованный из ABC_HG1N01, ABC_HG1N02, ABC_HG1N07, ABC_G1N01, ABC_G1N02, ABC_G1N03, ABC_G1N04, ABC_G1N05, ABC_G1N06, ABC_G1N07 или ABC_G1N08.
18. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по п. 1.
19. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 18.
20. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 19.
21. Клетка-хозяин по п. 20, причем клетка-хозяин выбрана из бактерий E. Coli, клетки яичника китайского хомячка, клетки HeLa и клетки NS0.
22. Нуклеиновая кислота по п. 18, причем нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40.
23. Способ получения антитела или его фрагмента, которые специфически связываются с внеклеточным доменом KLRG1 человека и яванского макака, при этом способ включает:
 - (a) обеспечение начального репертуара нуклеиновых кислот, кодирующих переменный домен, который либо включает CDR3, подлежащий замещению, либо не содержит CDR3-кодирующую область;
 - (b) объединение репертуара с донорной нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность, по существу изложенную в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79 или SEQ ID NO:85, так что донорная нуклеиновая кислота вставляется в область CDR3 в репертуаре, с обеспечением таким образом конечного репертуара нуклеиновых кислот, кодирующих переменный домен;
 - (c) экспрессирование нуклеиновых кислот конечного репертуара;
 - (d) выбор нуклеиновой кислоты со стадии (c), кодирующей переменный домен или его фрагмент, который специфически связывается с указанным внеклеточным доменом KLRG1 человека и яванского макака; и
 - (e) извлечение переменного домена или его фрагмента, или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный переменный домен или его фрагмент (d).
24. Антитело, полученное посредством способа по п. 23.
25. Способ модулирования активации CD8+ Т-клеток и естественных клеток-киллеров, включающий приведение в контакт лимфоцита с антителом к KLRG1 или его фрагментом.
26. Способ по п. 25, в котором лимфоцит представляет собой Т-клетку или естественную клетку-киллер.
27. Способ по п. 25, в котором антитело является таким, как указано в п. 1.
28. Способ по п. 25, в котором антитело является таким, как указано в п. 24.

29. Способ по п. 25, в котором антитело к KLRG1 модулирует активацию CD8+ Т- и естественных клеток-киллеров и ингибирует связывание Е-кадгерина с KLRG1 человека и яванского макака.
30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые перекрестно конкурируют с антителом по п. 1.
31. Композиция, содержащая антитело по п. 1.

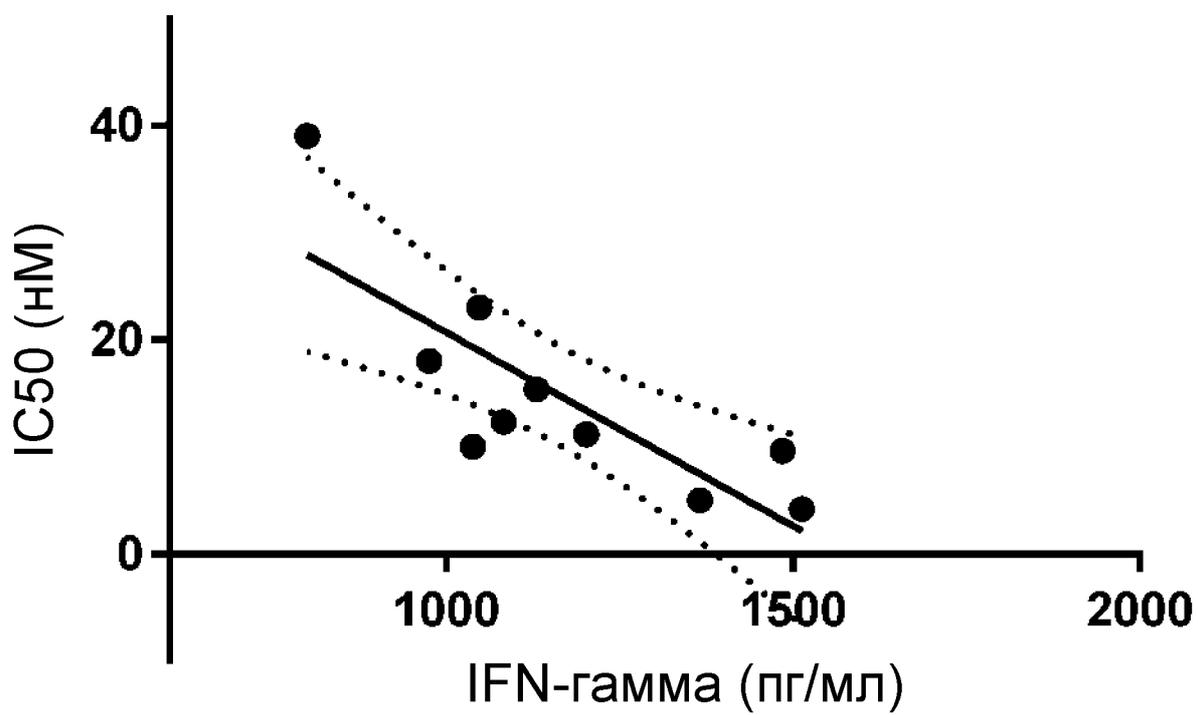


ФИГ. 1

Пролиферация CD8+ Т-клеток



ФИГ. 2



ФИГ. 3