

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039583**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.14

(21) Номер заявки
201892545

(22) Дата подачи заявки
2017.06.09

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

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ GITR И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/348,353; 62/432,023; 62/500,312

(32) 2016.06.10; 2016.12.09; 2017.05.02

(33) US

(43) 2019.05.31

(86) PCT/US2017/036818

(87) WO 2017/214548 2017.12.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Дельфино Фрэнк, Скокос Димитрис,
Ванг Бей (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Осипенко Н.В., Лебедев В.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф., Парамонова К.В. (RU)**

(56) WO-A2-2006105021

US-B2-8709424

US-A1-2015064204

RUDIHOFF S ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979, abstract

LEI LU ET AL.: "Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, vol. 12, no. 1, 7 February 2014 (2014-02-07), page 36, XP021176018, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-12-36, abstract, figures 1-5

KANAMARU F ET AL.: "COSTIMULATION VIA GLUCOCORTICOID-INDUCED TNF RECEPTOR IN BOTH CONVENTIONAL AND CD25+ REGULATORY CD4+ T CELLS", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 172, no. 12, 15 June 2004 (2004-06-15), pages 7306-7314, XP009076431, ISSN: 0022-1767, abstract, page 7309, figure 5

(57) В настоящем документе представлены антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связывают индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR), и способы их применения, в том числе, например, способы лечения с их применением.

B1

039583

039583

B1

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR), и к способам их применения.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Индукцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR) является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF). Экспрессия конститутивно является высокой в регуляторных Т-клетках, низкой/промежуточной в наивных Т-клетках, НК-клетках и гранулоцитах и индуцируется при активации. GITR взаимодействует со своим лигандом GITRL, который в основном экспрессируется на антиген-презентирующих клетках. Активация рецептора GITR может усиливать как пролиферацию, так и функцию эффекторных Т-клеток, а также ослаблять подавление, индуцируемое регуляторными Т-клетками. Следовательно, модуляция активности GITR может служить основой для иммунотерапии рака и иммунных нарушений. Таким образом, существует потребность в средствах, например антителах, которые модулируют активность GITR.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые связывают индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR). Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы, *inter alia*, для нацеливания на иммунные клетки, например на эффекторные Т-клетки, регуляторные Т-клетки и НК-клетки, которые экспрессируют GITR.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть непроцессированными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антиген-связывающую часть (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент), а также могут быть модифицированными с нарушением функциональности, например для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Типичные антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением перечислены в табл. 1 и 2 в настоящем документе. В табл. 1 излагаются идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных антител против GITR. В табл. 2 излагаются идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты для HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных антител против GITR.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают GITR, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, или по сути подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают GITR, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1, или по сути подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают GITR, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из типичных антител против GITR, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из 98/106; 162/170; 194/202; 242/250; 290/298; 338/402 и 346/402.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают GITR, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 1, или по сути подобной им последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают GITR, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 1, или по сути подобной им последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам,

которые специфически связывают G1TR, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1, или по сути подобной им последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают G1TR, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 1, или по сути подобной им последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают G1TR, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 1, или по сути подобной им последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают G1TR, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1, или по сути подобной им последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают G1TR, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR3 и LCVR3 (HCVR3/LCVR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR3, приведенных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR3, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR3/LCVR3, содержащуюся в любом из типичных антител против G1TR, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR3/LCVR3 выбрана из группы, состоящей из 104/112; 168/176; 200/208; 248/256; 296/304; 344/408 и 352/408.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают G1TR, содержащим ряд из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любых типичных антителах против G1TR, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления ряд аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из 100-102-104-108-110-112; 164-166-168-172-174-176; 196-198-200-204-206-208; 244-246-248-252-254-256; 292-294-296-300-302-304; 340-342-344-404-406-408 и 348-350-352-404-406-408.

Согласно родственному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают G1TR, содержащим ряд из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определяется любыми типичными антителами против G1TR, приведенными в табл. 1. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, которые специфически связывают G1TR, содержащим ряд аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из 98/106; 162/170; 194/202; 242/250; 290/298; 338/402 и 346/102. Способы и методики для идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в уровне техники и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрываемых в настоящем документе. Типичные правила, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общих словах определение по Kabat основано на вариативности последовательностей, определение по Chothia основано на расположении структурных петлевых областей, а определение по AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также существуют общедоступные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим антитела против G1TR или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приве-

шей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей. Согласно некоторым вариантам осуществления в данном аспекте настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом и HCVR, и LCVR подходят из одного и того же антитела против GITR, приведенного в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий переменную область тяжелой или легкой цепи антитела против GITR. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим любую из молекул нуклеиновых кислот, упомянутых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR, изложенных в табл. 1. Также объем настоящего изобретения охватывает клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев при условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и извлечение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

Настоящее изобретение относится к антителам против GITR, имеющим модифицированный паттерн гликозилирования. Согласно некоторым вариантам осуществления могут быть применимы модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или антитело, не имеющее фукозного фрагмента, присутствующего на олигосахаридной цепи, например, для усиления функции зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Для других применений может быть осуществлена модификация галактозилирования для модификации зависимой от компонента цитотоксичности (CDC).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которые специфически связывают GITR, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела против GITR и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту осуществления вторым терапевтическим средством является любое средство, которое успешно объединяется с антителом против GITR. Настоящее изобретение также относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим антитело против GITR, конъюгированное с цитотоксичным средством. Типичные комбинированные терапевтические средства, совместные составы и ADC, включающие в себя антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением, раскрываются далее в настоящем документе.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к терапевтическим способам уничтожения опухолевых клеток, или ингибирования, или ослабления роста опухолевых клеток, или иным образом лечения больного, пораженного раком, с использованием антитела против GITR или антиген-связывающей части антитела в соответствии с настоящим изобретением. Терапевтические способы в данном аспекте настоящего изобретения предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением субъекту, при необходимости этого. Подлежащим лечению нарушением является любое заболевание или состояние, которое улучшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем нацеливания на GITR и/или путем усиления пролиферации или функции Т-клеток и/или ингибирования подавления активности, индуцированной регуляторными Т-клетками.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к терапевтическим способам уничтожения опухолевых клеток, или ингибирования, или ослабления роста опухолевых клеток, или иным образом лечения больного, пораженного раком, с использованием комбинации антитела против GITR или антиген-связывающей части антитела против GITR и антитела против PD1 или антиген-связывающей части антитела против PD1. Терапевтические способы в данном аспекте настоящего изобретения предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей комбинацию композиции антитела против GITR и антитела против PD1 или антиген-связывающего фрагмента субъекту при необходимости этого. Подлежащим лечению нарушением является любое заболевание или состояние, которое улучшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем нацеливания как на GITR, так и на PD1.

Другие варианты осуществления станут понятными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны средние объемы опухоли для каждой обрабатываемой группы ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$), нанесенные на график против дней после провокации опухолью, как описывается в примере 7. Мышей обрабатывали либо изотипным антителом (незакрашенные кружочки, ○), антителом против PD-1 (незакрашенные квадраты, □), антителом против GITR (незакрашенные треугольники, Δ), либо комбинацией антитела против PD-1 и антитела против GITR (закрашенные перевернутые треугольники, ▽).

На фиг. 2 показан анализ выживаемости несущих MC38 мышей, обработанных комбинацией антитела против мышинового GITR и антитела против мышинового PD1, как описывается в примере 7. Мышей обрабатывали либо изотипным антителом (незакрашенные кружочки, ○), антителом против PD-1 (незакрашенные квадраты, □), антителом против GITR (незакрашенные треугольники, Δ), либо комбинацией антитела против PD-1 и антитела против GITR (незакрашенные перевернутые треугольники, ▽).

На фиг. 3 показана отдельная кривая роста опухоли у мышей без опухолей или необработанных контрольных мышей, провоцированных опухолевыми клетками MC38 или B16.F10.9, как описывается в примере 7.

На фиг. 4 показаны средние объемы опухоли для мышей, обработанных разными истощающими антителами, как описывается в примере 7.

На фиг. 5 показаны результаты анализа FACS внутриопухолевого отношения CD8/Treg, CD4 Teff/Treg, как описывается в примере 7.

На фиг. 6 показаны процент и число клеток/мм³ опухоли для подгрупп Т-клеток в опухоли, как описывается в примере 7.

На фиг. 7 показаны средние объемы опухоли для каждой обрабатываемой группы (мм³ ± SEM), нанесенные на график против дней после провокации опухолью, как показано в примере 7.

На фиг. 8 показан анализ выживаемости несущих MC38 гуманизированных GITR/GIRL мышей, обработанных комбинацией антитела против человеческого GITR и антитела против мышиного PD1, как описывается в примере 7.

На фиг. 9 показан анализ FACS внутриопухолевого и селезеночного процента CD8 Т-клеток, процента Treg-клеток и отношения CD8/Treg, как описывается в примере 7.

На фиг. 10 показаны средние объемы опухоли для каждой обрабатываемой группы (мм³ ± SEM), нанесенные на график против дней после провокации опухолью, как описывается в примере 7.

На фиг. 10 показан анализ выживаемости несущих MC38 гуманизированных PD1/PDL1 мышей, обработанных комбинацией антитела против мышиного GITR и антитела против человеческого PD1, как описывается в примере 7.

На фиг. 12 показана кривая роста опухоли несущих MC38 мышей, как описывается в примере 7. На оси Y показан объем опухоли в кубических миллиметрах, а на оси X показано время в днях после провокации опухолью. Незакрашенные символы (□, ○) представляют мышей, впервые обработанных изотипным антителом (контроль). Закрашенные символы (■, ●) представляют мышей, впервые обработанных антителом против CD226. Те мыши, которых затем обрабатывали изотипным антителом, представлены кружочками (○, ●) и сплошными линиями. Те мыши, которых затем обрабатывали комбинацией антитела против GITR и антитела против PD-1, представлены квадратами (□, ■) и пунктирными линиями.

На фиг. 13 показана кривая выживаемости несущих MC38 мышей, как описывается в примере 7. На оси Y показан процент выживших, а на оси X показано время в днях после провокации опухолью. Незакрашенные символы (□, ○) представляют мышей, впервые обработанных изотипным антителом (контроль). Закрашенные символы (■, ●) представляют мышей, впервые обработанных антителом против CD226. Те мыши, которых затем обрабатывали изотипным антителом, представлены кружочками (○, ●) и сплошными линиями. Те мыши, которых затем обрабатывали комбинацией антитела против GITR и антитела против PD-1, представлены квадратами (□, ■) и пунктирными линиями.

На фиг. 14 показана кривая роста опухоли несущих MC38 мышей дикого типа (представленных ромбами [◇, ◆]) или нокаутных мышей TIGIT (представленных треугольниками [△, ▲]), обработанных изотипными IgG, как описывается в примере 7. На оси Y показан объем опухоли в кубических миллиметрах, а на оси X показано время в днях после провокации опухолью. Незакрашенные символы и пунктирные линии представляют мышей, впервые обработанных изотипным антителом (контроль). Закрашенные символы и сплошные линии представляют мышей, впервые обработанных антителом против CD226.

На фиг. 15 показана кривая роста опухоли несущих MC38 мышей дикого типа (представленных кружочками [○, ●]) или нокаутных мышей TIGIT (представленных перевернутыми треугольниками [▽, ▼]), обработанных изотипными IgG, как описывается в примере 7. На оси Y показан объем опухоли в кубических миллиметрах, а на оси X показано время в днях после провокации опухолью. Незакрашенные символы и пунктирные линии представляют мышей, впервые обработанных изотипным антителом (контроль). Закрашенные символы и сплошные линии представляют мышей, впервые обработанных антителом против CD226.

На фиг. 16 представлены графики кумулятивной функции распределения (CDF), изображающие активированную экспрессию CD226 с помощью комбинированной обработки общих (панель А), клональных размноженных (панель В) или неразмноженных (панель С) CD8+ Т-клеток. На оси X показана экспрессия CD226 в log₂(RPKM) ("Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads"), а на оси Y показана накопленная частота. Красная линия представляет обработку антителом против GITR/антителом против PD1; черная линия представляет обработку изотипным антителом; синяя линия представляет обработку антителом против GITR; а фиолетовая линия представляет обработку антителом против PD1.

На фиг. 17 представлен вестерн-блоттинг, изображающий относительную экспрессию фосфо-CD3ζ и фосфо-CD226 как функцию концентрации PD-1.

На фиг. 18 панели А-Д изображают столбиковые диаграммы ряда типов Т-клеток, полученные у дикого типа (незаштрихованные столбики) и нокаутных по CD226 мышей (заштрихованные столбики). На панели А представлена столбиковая диаграмма, изображающая анализ FACS (ряда клеток) Т-

клеточного развития в тимусе (T_{conv}, конвенциональные Т-клетки; DP, CD4/CD8 двойные положительные; SP, одинарные положительные; DN, CD4/CD8 двойные отрицательные). На панели В представлена столбиковая диаграмма, изображающая валидацию FACS (ряда клеток) популяции подгрупп Т-клеток в селезенке и крови животных дикого типа и CD226^{-/-} животных. На панели С представлена столбиковая диаграмма, изображающая анализ FACS (MFI, средняя интенсивность флуоресценции) подгрупп Т-клеток в селезенке и крови, которые экспрессируют PD1. На панели D представлена столбиковая диаграмма, изображающая анализ FACS (MFI) подгрупп Т-клеток в селезенке и крови, которые экспрессируют GITR. На панелях E-I представлены столбиковые диаграммы, изображающие секрецию воспалительных цитокинов в пикограммах на миллилитр при *ex vivo* стимуляции TCR спленоцитов с помощью Ab против CD3 + против CD28 в течение 16 ч. Спленоциты от CD226^{-/-} мышей (заштрихованные столбики) или мышей дикого типа (WT) (незаштрихованные столбики) стимулировали с помощью Ab против CD3 + против CD28 в течение 16 ч. Панель E=IFN- γ ; панель F=IL-2; панель G=TNF- α ; панель H=IL-6 и панель I=IL-5.

На фиг. 19 представлен линейный график, изображающий процент выживших животных как функцию времени в днях после провокации опухолью. Панель А показывает мышей CD226 KO (розовые линии) или однопометников WT (черные линии), зараженных опухолевыми клетками MC38 и обработанных либо Ab против GITR + Ab против PD-1 (закрашенные кружочки и квадраты), либо изотипными Ab (незакрашенные кружочки и квадраты). На панелях B-D показан эффект обработки антителом у (B) животных, обработанных антителом, блокирующим CD28 передачу сигнала (10 мг/кг CTLA-4-Ig; панель B, зеленые линии); (C) животных, обработанных антителом, блокирующим OX40 передачу сигнала (10 мг/кг блокирующего OX40L антитела; панель C); и (D) животных, обработанных антителом, блокирующим 4-1BB передачу сигнала (10 мг/кг блокирующего 4-1BBL антитела; панель D).

На фиг. 20 представлен линейный график, изображающий размер опухоли (в кубических миллиметрах) как функцию дней после провокации опухолью для мышей, обработанных изотипным антителом (незакрашенные кружочки и черная линия), антителом против PD1 (незакрашенные квадраты, красная линия), антителом против GITR (незакрашенные прямоугольные треугольники и зеленая линия) и комбинированной терапией антитело против GITR/антитело против PD1 (незакрашенные перевернутые треугольники и синие линии). Панель А представляет опухоли MC38, не экспрессирующие CD155. Панель В представляет опухоли MC38, экспрессирующие CD155.

На фиг. 21 представлена столбиковая диаграмма, изображающая ряд клеток, экспрессирующих CD226 (панель А), 4-1BB (панель В) и IFN- γ (панель С), от животных, зараженных опухолевыми клетками MC38, надэкспрессирующими CD155 (заштрихованные столбики), и клетками MC38, неэкспрессирующими CD155 (незаштрихованные столбики).

На фиг. 22 представлен точечный график анализа RNA-seq опухолевых биоптатов больших раком, демонстрирующий экспрессию CD226 РНК (в \log_2 [RPKM]) как функцию обработки Ab против PD-1.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед описанием настоящего изобретения следует упомянуть, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описываемыми способами и экспериментальными условиями, в связи с этим способы и условия могут варьировать. Также следует учитывать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что традиционно понятно рядовому специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного упомянутого числового значения означает, что значение может варьировать от упомянутого значения не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает в себя 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описываемым в настоящем документе, могут быть использованы в осуществлении или тестировании настоящего изобретения, далее описываются предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определения

Используемое в настоящем документе выражение "индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли", "GITR" и т.п. относится к человеческому индуцируемому глюкокортикоидом рецептору фактора некроза опухоли, содержащему аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 413 (№ доступа в NCBI NP_004186,1). Выражение "GITR" включает в себя и мономерные и мультимерные GITR молекулы. Используемое в настоящем документе выражение "мономерный человеческий GITR" означает белок GITR или его часть, которые не содержат или не имеют какие-либо мультимерные

тимеризирующие домены и которые существуют при нормальных условиях в виде одиночной молекулы G1TR без непосредственного физического соединения с другой молекулой G1TR. Типичная мономерная молекула G1TR представляет собой молекулу, называемую в настоящем документе "hG1TR.mmh", содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 409 (см., например, пример 3 в настоящем документе). Используемое в настоящем документе выражение "димерный человеческий G1TR" означает конструкцию, содержащую две молекулы G1TR, соединенные друг с другом через линкер, ковалентную связь, нековалентную связь или через мультимеризирующий домен, такой как Fc-домен антитела. Типичные димерные молекулы G1TR включают в себя такие молекулы, которые называются в настоящем документе "hG1TR.mFc" и "hG1TR.hFc", содержащие аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 411 соответственно (см., например, пример 3 в настоящем документе).

Все упоминания белков, полипептидов и белковых фрагментов в настоящем документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если явно не указано, что оно относится к отличному от человека виду. Таким образом, выражение "G1TR" означает человеческий G1TR, если явно не указано, что оно относится к отличному от человека виду, например к "мышинному G1TR", "G1TR обезьяны" и т.д.

Используемое в настоящем документе выражение "экспрессируемый клеточной поверхностью G1TR" означает один или несколько белков G1TR, или их внеклеточный домен, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* так, что по меньшей мере часть белка G1TR выставляется на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна антиген-связывающей части антитела. "Экспрессируемый клеточной поверхностью G1TR" может содержать или состоять из белка G1TR, экспрессируемого на поверхности клетки, которая в норме экспрессирует белок G1TR. В качестве альтернативы "экспрессируемый клеточной поверхностью G1TR" может содержать или состоять из белка G1TR, экспрессируемого на поверхности клетки, которая в норме не экспрессирует человеческий G1TR на своей поверхности, но была искусственно сконструирована для экспрессии G1TR на своей поверхности.

Используемое в настоящем документе выражение "антитело против G1TR" включает в себя и одновалентные и моноспецифические двухвалентные антитела с одной специфичностью, а также биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает G1TR, и второе плечо, которые связывает второй (целевой) антиген, при этом плечо антитела против G1TR содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, изложенных в табл. 1 в настоящем документе. Выражение "антитело против G1TR" также включает в себя конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело против G1TR или его антиген-связывающую часть, конъюгированные с лекарственным средством или токсином (т.е. цитотоксичным средством). Выражение "антитело против G1TR" также включает в себя конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие антитело против G1TR или его антиген-связывающую часть, конъюгированные с радионуклидом.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" означает любую антиген-связывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарную область (CDR), которая специфически связывается с конкретным антигеном (например, G1TR) или взаимодействует с таковым. Термин "антитело" включает в себя иммуноглобулиновые молекулы, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращается в настоящем документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращается в настоящем документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L могут быть далее поделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела против G1TR (или его антиген-связывающей части) могут быть идентичны последовательностям человеческой зародышевой линии или могут быть естественно или искусственно модифицированными. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основе одновременного анализа двух или более CDR.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также включает в себя антиген-связывающие фрагменты полноразмерных молекул антитела. Используемые в настоящем документе термины "антиген-связывающая часть" антитела, "антиген-связывающий фрагмент" антитела и т.п. предусматривают встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или полученный с помощью методов генетической инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антиген-связывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методики генетической инженерии для создания рекомбинантных молекул, предусматривающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирую-

шей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотек антител в фагах), или ее можно синтезировать. ДНК можно подвергнуть секвенированию и химическому манипулированию или манипулированию с использованием способов молекулярной биологии, например с целью приведения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или с целью введения кодонов, создания остатков цистеина, модифицирования, добавления или делетирования аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с делетированными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетраатела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также попадают под используемое в настоящем документе выражение "антиген-связывающий фрагмент".

Антиген-связывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержит по меньшей мере одну область CDR, которая примыкает или находится в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, в которых домен V_H связан с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В качестве альтернативы антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

Согласно некоторым вариантам осуществления антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие типичные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антиген-связывающем фрагменте антитела в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3 и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе в любой из типичных конфигураций, приведенных выше, переменные и константные домены либо могут быть непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, результатом чего является гибкая или полугибкая связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антиген-связывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами в соответствии с настоящим изобретением (например, за счет дисульфидной связи(ей)).

Как и полноразмерные молекулы антител, антиген-связывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антиген-связывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с разными эпитопами на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, в том числе форматы типичных биспецифических антител, раскрываемые в настоящем документе, можно адаптировать для использования в контексте антиген-связывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением с использованием обычных методов, доступных в данной области.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут функционировать посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Термин "комплемент-зависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток под действием антитела в соответствии с настоящим изобретением в присутствии комплемента. Термин "антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (ADCC) относится к клеточно-опосредованной реакции, в ходе которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, являющиеся природными киллерами (NK) клетки, нейтрофилы и макрофаги), распознают связавшееся антитело на поверхности целевой клетки и тем самым приводят к лизису целевой клетки. CDC и ADCC можно определить, используя анализы, которые хорошо известны и доступны в уровне техники. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337, а также Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95: 652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность.

Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательна ли для антитела опосредование цитотоксичности.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением являются человеческими антителами. Используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" включает в себя антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулинов человека. Человеческие антитела в соответствии с настоящим изобретением могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии иммуноглобулинов человека (например, за счет мутаций, внесенных путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*), например в CDR и, в частности в CDR3. Однако используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не должен включать в себя антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из последовательностей зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности. Термин "человеческое антитело" не включает в себя встречающиеся в природе молекулы, которые в норме существуют без модификации или вмешательства/манипуляции человека, во встречающемся в природе немодифицированном живом организме.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением согласно некоторым вариантам осуществления могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" должен охватывать все человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными методами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описанные ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанные ниже), антитела, полученные от животных (например, мыши), являющиеся трансгенными по генам человеческих иммуноглобулинов (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим методом, который предусматривает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, происходящие из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулинов человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител являются последовательностями, которые хотя и происходят из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и являются родственными для таковых, не могут существовать естественным образом в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с гетерогенностью шарниров. В одной форме иммуноглобулиновая молекула содержит подходящую конструкцию из четырех цепей приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связываются посредством межцепочечных дисульфидных связей, и образуется молекула приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно соединенных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы было чрезвычайно сложно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обуславливается без ограничения структурными различиями, ассоциированными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может существенно снизить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, как правило, наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнире, область C_H2 или C_H3 которой может быть желательна, например, при получении, для повышения выхода желаемой формы антитела.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть выделенными антителами. Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или отделено от по меньшей мере одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое было выделено или отделено от по меньшей мере одного компонента организма, ткани или клетки, в которых антитело существует в природе или продуцируется в природе, является "выделенным антителом" в рамках настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенными антителами являются антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело может, по сути, не содержать другой клеточный материал и/или другие химические вещества.

Раскрываемые в настоящем документе антитела против GITR могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии,

из которой походят данные антитела. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из находящихся в общем доступе баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение относится к антителам и к их антиген-связывающим фрагментам, которые получены из любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей, при этом одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR областях являются мутировавшими по соответствующему остатку(ам) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или по соответствующему остатку(ам) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или по консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности собирательно называются в настоящем документе как "мутации зародышевой линии"). Рядовой специалист в данной области, исходя из раскрываемых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления все каркасные и/или CDR остатки в доменах V_H и/или V_L являются мутировавшими обратно до остатков, обнаруживаемых в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки являются мутировавшими обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например только мутировавшие остатки, обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или мутировавшие остатки, обнаруживаемые только в CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков являются мутировавшими в соответствующие остатки отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно было получено антитело). Вместе с тем, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR областях, в которой, например, некоторые отдельные остатки являются мутировавшими в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или являются мутировавшими в соответствующий остаток отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антиген-связывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать на предмет одного или нескольких необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или увеличенные антагонистические или агонистические биологические свойства (при соответствующих обстоятельствах), уменьшенная иммуногенность и т.д. Настоящее изобретение относится к антителам и антиген-связывающим фрагментам, которые в целом получены таким способом.

Настоящее изобретение также относится к антителам против GITR, содержащим варианты любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам против GITR, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, изложенных в табл. 1 в настоящем документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антиген-связывающим сайтом в переменной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными участками на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп получают с помощью пространственно совмещенных аминокислот из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейным эпитопом является эпитоп, образуемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых случаях эпитоп может включать в себя фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по сути идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании при помощи соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей нитью) имеет место идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере у приблизительно 90%, и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований согласно результатам измерения при помощи любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, которые обсуждаются ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в определенных случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или, по сути, сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной

молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по сути сходный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BESTFIT, с применением штрафов за открытие гэпов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену, при которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень сходства можно скорректировать до надлежащей по консервативной природе замены. Способы осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами включают в себя 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в работе Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Термин "умеренно консервативное" замещение означает любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности при помощи измерений сходства, присвоенного различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версию 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать при помощи FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательности для областей с наилучшим совпадением между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000), *supra*). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности в соответствии с настоящим изобретением с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, работы Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Антитела против GITR, содержащие варианты Fc

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения представлены антитела против GITR, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с FcRn-рецептором, например при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение относится к антителам против GITR, содержащим мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом мутация(и) увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где величина pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке в случае введения животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T); 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428, и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация включает в себя модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V59I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модифи-

кацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L), а также модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение относится к антителам против GITR, содержащим Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеперечисленных мутаций Fc-домена, а также других мутаций в переменных доменах антител, раскрываемых в настоящем документе, входят в объем настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител против GITR

Настоящее изобретение относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые связывают мономерный человеческий GITR с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение относится к антителам против GITR, которые связывают мономерный человеческий GITR (например, hGITR.mmh) с K_D менее чем приблизительно 5,0 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления представлены антитела против GITR, которые связывают мономерный человеческий GITR при 37°C с K_D менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ или менее чем приблизительно 1,50 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые связывают мономерный человеческий GITR (например, hGITR.mmh) с диссоциативным временем полужизни ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 12 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления представлены антитела против GITR, которые связывают мономерный человеческий GITR при 37°C с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 12 мин, более чем приблизительно 13 мин, более чем приблизительно 14 мин, более чем приблизительно 15 мин или больше, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые связывают димерный человеческий GITR (например, hGITR.mFc) с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение относится к антителам против GITR, которые связывают димерный человеческий GITR с K_D менее чем приблизительно 950 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления представлены антитела против GITR, которые связывают димерный человеческий GITR при 37°C с K_D менее чем приблизительно 900 пМ, менее чем приблизительно 850 пМ, менее чем приблизительно 800 пМ, менее чем приблизительно 700 пМ, менее чем приблизительно 600 пМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ или менее чем приблизительно 100 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые связывают димерный человеческий GITR (например, hGITR.mFc) с диссоциативным временем полужизни ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 7 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления представлены антитела против GITR, которые связывают димерный человеческий GITR при 37°C с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 20 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 40 мин, более чем приблизительно 50 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 70 мин, более чем приблизительно 80 мин, более чем приблизительно 90 мин, более чем приблизительно 100 мин или больше, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 3 в настоящем документе, или по сути подобного анализа.

Настоящее раскрытие также относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые связывают экспрессируемый на клеточной поверхности GITR. Например, в настоящем документе представлены антитела, которые связывают трансфицированные человеческим GITR эмбриональные клетки почки 293 (HEK-293) D9 с высокой аффинностью. Например, настоящее раскрытие относится к антителам против GITR, которые связывают трансфицированные человеческим GITR эмбриональные клетки почки 293 (HEK-293) D9 с EC_{50} менее чем приблизительно 260 пМ, как измерено с помощью электрохемилюминесценции, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 4 в

настоящем документе, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления представлены антитела против GITR, которые связывают трансфицированные человеческим GITR эмбриональные клетки почки 293 (HEK-293) D9 с EC_{50} менее чем приблизительно 250 пМ, менее чем приблизительно 240 пМ, менее чем приблизительно 230 пМ или менее чем приблизительно 220 пМ, как измерено с помощью электрохемилюминесценции, например, с использованием формата анализа, определяемого в примере 4 в настоящем документе, или по сути подобного анализа.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут обладать одной или несколькими из упомянутых выше биологических характеристик или любой их комбинацией. Изложенный выше перечень биологических характеристик антител в соответствии с настоящим изобретением не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики антител в соответствии с настоящим изобретением станут понятны рядовому специалисту в данной области при рассмотрении настоящего раскрытия, в том числе рабочих примеров в настоящем документе.

Зависимая от заякоривания Fc и независимая от заякоривания активация GITR и блокирование GITRL

Настоящее раскрытие относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, которые активируют человеческий GITR, например, как определяется в форматах анализа, описываемых в примере 5 и/или примере 6 в настоящем документе, или в по сути подобном формате анализа. Используемое в настоящем документе выражение "активирует человеческий GITR" относится к активации GITR посредством связывания с его когнатным лигандом - лигандом GITR (GITRL) или к связыванию агонистического связывающего антиген белка(ов) против GITR с GITR. В отношении активации GITR агонистическими связывающими антиген белками против GITR активация может происходить в присутствии или в отсутствие заякоривания антиген-связывающего белка на Fc-гамма-рецепторах. Активация человеческого GITR выражается в проявлении определенных биологических активностей, в том числе без ограничения в индуцировании или усилении передачи сигнала GITR *in vitro* или *in vivo*, снижении подавления регуляторными T-клетками активности эффекторных T-клеток; снижении уровней циркулирующих регуляторных T-клеток *in vitro* или *in vivo*, снижении внутриопухолевых регуляторных T-клеток *in vivo*, активации эффекторных T-клеток *in vitro* или *in vivo*, индуцировании или усилении пролиферации эффекторных T-клеток *in vitro* или *in vivo* или ингибировании или снижении роста опухоли *in vivo*.

Активация GITR в отсутствие заякоривания Fc

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящем документе, активируют человеческий GITR в отсутствие заякоривания Fc, например, как определяется в форматах анализа, описываемых в примере 5 и/или примере 6 в настоящем документе, или в по сути подобном формате анализа. Используемое в настоящем документе выражение "в отсутствие заякоривания Fc" относится к активации GITR и опосредованной GITR передаче сигнала или блокированию GITRL без кластеризации антител против GITR различными формами Fc-гамма-рецептора, и это может быть определено и количественно измерено посредством, например, активации первичных T-клеток, совместно культивируемых *in vitro* в отсутствие связанного с клеточной поверхностью Fc-гамма-рецептора(ов). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR при проценте активации более чем приблизительно 25% при EC_{50} менее чем приблизительно 3 нМ в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR при проценте активации более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60% или более чем приблизительно 65% при EC_{50} менее чем приблизительно 3 нМ в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR при проценте активации более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60% или более чем приблизительно 65% при EC_{50} менее чем приблизительно 2 нМ в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR при проценте активации более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60% или более чем приблизительно 65% при EC_{50} менее чем приблизительно 1,5 нМ в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR при проценте активации более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60% или более чем приблизительно 65% при EC_{50} менее чем приблизительно 1,4 нМ в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью ана-

лиза по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR при проценте активации более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60% или более чем приблизительно 65% при EC₅₀ менее чем приблизительно 1,3 нМ в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент связывает GITR и демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток, например, как описывается в примере 6, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент связывает GITR и демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в отсутствие заякоривания Fc с EC₅₀ приблизительно 8 нМ или меньше, как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток, например, как описывается в примере 6, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент связывает GITR и демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в отсутствие заякоривания Fc, по меньшей мере в 2, по меньшей мере в 3, по меньшей мере в 4, по меньшей мере в 5, по меньшей мере в 6, по меньшей мере в 7, по меньшей мере в 8, по меньшей мере в 9, по меньшей мере в 10 или по меньшей мере в 11 раз выше исходной, при концентрации приблизительно 22 нМ антитела (или антиген-связывающего фрагмента), как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток, например, как описывается в примере 6, или по сути подобного формата анализа.

Активация GITR в присутствии заякоривания Fc

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящем документе, активируют человеческий GITR в присутствии заякоривания Fc, например, как определяется в форматах анализа, описываемых в примере 5 и/или примере 6 в настоящем документе, или в по сути подобном формате анализа. Используемое в настоящем документе выражение "в присутствии заякоривания Fc" относится к активации GITR и опосредованной GITR передаче сигнала или блокированию GITRL через кластеризацию антител против GITR путем взаимодействия Fc-области антител с разными формами Fc-гамма-рецептора (FcγR), такими как FcγRI, FcγRIIa или FcγRIIb, и это может быть определено и количественно измерено посредством, например, активации Т-клеток, совместно культивируемых *in vitro* в присутствии связанного с клеточной поверхностью Fc-гамма-рецептора(ов).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в присутствии заякоривания Fc по меньшей мере в приблизительно 2 раза выше исходной при концентрации приблизительно 33 нМ антитела (или антитело-связывающего фрагмента), как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток, например, как описывается в примере 6, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в присутствии заякоривания Fc, по меньшей мере в приблизительно 2 раза, по меньшей мере в приблизительно 3 раза, по меньшей мере в приблизительно 4 раза или по меньшей мере в приблизительно 5 раз выше исходной, при концентрации приблизительно 33 нМ антитела (или антиген-связывающего фрагмента), как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток, например, как описывается в примере 6, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в присутствии заякоривания Fc с EC₅₀ менее чем приблизительно 34 нМ, как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток, например, как описывается в примере 6, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в присутствии заякоривания Fc с EC₅₀ менее чем приблизительно 30 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ или менее чем приблизительно 4 нМ, как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток, например, как описывается в примере 6, или по сути подобного формата анализа.

Антитела, которые блокируют опосредуемую лигандом GITR стимуляцию рецептора

Настоящее раскрытие относится к антителам, которые блокируют опосредуемую лигандом человеческого GITR (hGITRL) стимуляцию рецептора, например, как определяется в формате анализа, описываемого в примере 5 в настоящем документе. Используемое в настоящем документе выражение "блокирует опосредуемую лигандом человеческого GITR (hGITRL) стимуляцию рецептора" относится к способности связывающих антиген белков против GITR блокировать связывание GITR с его когнатным ли-

гандом GITRL. Блокирование лиганда G1TR может нарушать подавление активности эффекторных Т-клеток регуляторными Т-клетками. Блокирование лиганда G1TR может быть определено и количественно измерено с помощью ряда способов, известных в уровне техники, в том числе, например, снижение Т-клеточной пролиферации или секреции цитокина и повышение уровней циркулирующих регуляторных Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, представленные в настоящем документе, блокируют опосредуемую лигандом человеческого G1TR (hGITRL) стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания G1TR, например, как определяется в формате анализа, описываемого в примере 5 в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антитело-связывающий фрагмент блокирует опосредуемую лигандом человеческого G1TR стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc с процентом блокирования более чем приблизительно 55% с IC₅₀ менее чем приблизительно 4,0 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антитело-связывающий фрагмент блокирует опосредуемую лигандом человеческого G1TR стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc с процентом блокирования более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 80% или более чем приблизительно 85% с IC₅₀ менее чем приблизительно 4,0 нМ, менее чем приблизительно 3,0 нМ, менее чем приблизительно 2,0 нМ, менее чем приблизительно 1,0 нМ, менее чем приблизительно 0,9 нМ, менее чем приблизительно 0,8 нМ или менее чем приблизительно 0,7 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, как описывается в примере 5, или по сути подобного формата анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты активируют человеческий G1TR и блокируют опосредуемую лигандом человеческого G1TR стимуляцию рецептора при проценте блокирования менее чем приблизительно 25% в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, в анализе, описываемом в примере 5 или по сути подобном анализе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты активируют человеческий G1TR и блокируют опосредуемую лигандом человеческого G1TR стимуляцию рецептора при проценте блокирования менее чем приблизительно 54% в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, в анализе, описываемом в примере 5 или по сути подобном анализе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты активируют человеческий G1TR и блокируют опосредуемую лигандом человеческого G1TR стимуляцию рецептора при проценте блокирования менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5% или менее чем приблизительно 1% в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, в анализе, описываемом в примере 5 или по сути подобном анализе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты активируют человеческий G1TR при проценте активации по меньшей мере приблизительно 50% и не блокируют опосредованную hGITRL стимуляцию рецептора при проценте блокирования более чем приблизительно 50% в отсутствие заякоривания Fc, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB, например, в анализе, описываемом в примере 5 или по сути подобном анализе.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты и активируют человеческий G1TR и блокируют опосредуемую лигандом человеческого G1TR (hGITRL) стимуляцию рецептора.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и активируют человеческий G1TR и блокируют опосредуемую лигандом человеческого G1TR (hGITRL) стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc, например, как определяется в формате анализа, описываемого в примере 5 в настоящем документе, или в по сути подобном анализе. Согласно некоторым вариантам осуществления

(А) антитело или антиген-связывающий фрагмент обладает по меньшей мере одним из свойств, выбранных из группы, состоящей из

i) активации человеческого G1TR в отсутствие заякоривания Fc при проценте активации более чем приблизительно 25% при EC₅₀ менее чем приблизительно 3 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB; и

ii) активация человеческого G1TR в отсутствие заякоривания Fc с EC₅₀ менее чем приблизительно 1,0 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB; и

(В) антитело или антиген-связывающий фрагмент блокирует опосредованную hGITRL стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc при проценте блокирования более чем приблизительно 54% с IC₅₀ менее чем приблизительно 4,0 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB.

Согласно некоторым вариантам осуществления

(А) антитело или антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий G1TR в отсутствие заякоривания Fc при проценте активации более чем приблизительно 50% при EC₅₀ менее чем прибли-

тельно 1,5 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB; и

(В) антитело или антиген-связывающий фрагмент блокирует опосредованную hGITRL стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc при проценте блокирования более чем приблизительно 54% с IC₅₀ менее чем приблизительно 4,0 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB.

Картирование эпитопа и связанные с этим технологии

Эпитоп, с которым связываются антитела в соответствии с настоящим изобретением, может состоять из одной непрерывной последовательности 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка GITR. В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества несопряженных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) GITR. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп располагается на GITRL-связывающем домене GITR или рядом с таковым. Согласно другим вариантам осуществления эпитоп располагается вне GITRL-связывающего домена GITR, например, в положении на поверхности GITR, в котором антитело при связывании с таким эпитопом не мешает связыванию GITRL с GITR.

Различные методики, известные рядовым специалистам в данной области, могут быть использованы для определения того, взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами в полипептиде или белке. Типичные методики включают в себя, например, рутинный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), мутационный анализ методом аланинового сканирования, блот-анализ пептидов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ пептидного расщепления. Кроме того, могут быть использованы способы, такие как эпитопное исключение, эпитопная экстракция и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общих словах, способ водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, обеспечивают осуществление водородно-дейтериевого обмена во всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу с выявлением тем самым меченных дейтерием остатков, соответствующих конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к антителам против GITR, которые связываются с тем же эпитопом, что и любые из конкретных типичных антител, описываемых в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, изложенных в табл. 1 в настоящем документе). Подобным образом настоящее изобретение также относится к антителам против GITR, которые конкурируют за связывание с GITR с любым из конкретных типичных антител, описываемых в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, изложенных в табл. 1 в настоящем документе).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с ним с эталонным антителом против GITR, с использованием рутинных способов, известных в уровне техники и продемонстрированных в настоящем документе. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против GITR в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают связывание эталонного антитела с белком GITR. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой GITR. Если тестируемое антитело способно связываться с GITR после насыщения связи с эталонным антителом против GITR, то можно сделать вывод о том, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело против GITR. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой GITR после насыщения связи с эталонным антителом против GITR, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом против GITR в соответствии с настоящим изобретением. Затем может быть выполнен дополнительный рутинный эксперимент (например, анализы пептидной мутации и связывания) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела объясняется связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или за наблюдаемое отсутствие связывания отвечает пространственное блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, Вiascore, проточной цитометрии или любых другого имеющегося в уровне техники количественного или качественного анализа связывания антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы, считают, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по сути все ами-

нокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Считают, что два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только подгруппа аминокислотных мутаций, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным антителом против G1TR, описываемые выше методы определения связывания выполняют в двух направлениях. В первом направлении обеспечивают связывание эталонного антитела с белком G1TR при насыщающих условиях с последующим оцениванием связывания тестируемого антитела с молекулой G1TR. Во втором направлении тестируемое антитело обеспечивают связывание с молекулой G1TR при насыщающих условиях с последующим оцениванием связывания эталонного антитела с молекулой G1TR. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой G1TR, то делают вывод о том, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с G1TR. Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может пространственно блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Получение человеческого антитела

Антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением могут быть полностью человеческими антителами. Способы создания моноклональных антител, в том числе полностью человеческих моноклональных антител, известны в уровне техники. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с человеческим G1TR.

С использованием технологии VELOCIMMUNE™, например, или любого другого подобного известного способа создания полностью человеческих моноклональных антител сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела против G1TR, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как в представленном ниже экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают по желаемым характеристикам, в том числе по аффинности, активности блокирования лиганда, селективности, эпитопу т.д. При необходимости мышинные константные области заменяют желаемой человеческой константной областью, например IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, с созданием полностью человеческого антитела против G1TR. Тогда как выбранная константная область может варьировать согласно конкретному применению, в переменной области находятся характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности по отношению к цели. В некоторых случаях полностью человеческие антитела против G1TR выделяют непосредственно из антиген-положительных В-клеток.

Биоэквиваленты

Антитела против G1TR и фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых описываемых антител, но которые сохраняют способность связывать человеческий G1TR. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одну или несколько добавок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, которая по сути эквивалентна таковой описываемых антител. Подобным образом, кодирующие антитело против G1TR последовательности ДНК в соответствии с настоящим изобретением охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько добавок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрываемой последовательностью, но которые кодируют антитело против G1TR или фрагмент антитела, которые по сути являются биоэквивалентными антителу против G1TR или фрагменту антитела в соответствии с настоящим изобретением. Примеры таких вариантов аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждаются выше.

Два антиген-связывающих белка или антитела считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, чья скорость и степень абсорбции не проявляют существенной разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, либо в однократной дозе, либо в нескольких дозах. Некоторые антитела будут считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в лечении, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и в медицинском отношении считаются незначимыми для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентами, если отсутствуют клинически значимые отличия в их безопасности, чистоте и эффективности.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентами, если большой может быть переведен один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без предполагаемого усиления риска побочных эффектов, в том числе клинически зна-

чего изменения в иммуногенности или снижения эффективности по сравнению с продолжающейся терапией без такого перевода.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентами, если они действуют посредством общего механизма или механизмов действия для состояния или состояний, в отношении которых применяются, в той степени, в которой известны такие механизмы.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована *in vivo* и *in vitro* способами. Меры биоэквивалентности включают в себя, например, (a) *in vivo* тест на людях или других млекопитающих, у которых концентрация антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) *in vitro* тест, который был коррелирован с данными и достоверно прогнозирует данные биодоступности у человека *in vivo*; (c) *in vivo* тест на людях или других млекопитающих, у которых соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его цели) измеряют как функцию времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, которое устанавливает безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител против GITR в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей, или путем делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, не являющиеся важными для биологической активности, могут быть делетированы или заменены другими аминокислотами для предупреждения образования излишних или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител против GITR, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации которые отменяют или устраняют гликозилирование.

Видовая селективность и видовая перекрестная реактивность

Настоящее изобретение, согласно некоторым вариантам осуществления относится к антителам против GITR, которые связываются с человеческим GITR, но не с GITR других видов. Настоящее изобретение также относится к антителам против GITR, которые связываются с человеческим GITR и с GITR одного или нескольких отличных от человека видов. Например, антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с человеческим GITR и могут связываться или могут не связываться, в зависимости от случая, с одним или несколькими из GITR мыши, крысы, морской свинки, хомячка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, игрунки, макака резус или шимпанзе. Согласно некоторым типичным вариантам осуществления настоящего изобретения представлены антитела против GITR, которые специфически связывают GITR человека и GITR яванского макака (например, *Macaca fascicularis*). Другие антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением связываются с GITR человека, но не связываются или только слабо связываются с GITR яванского макака.

Мультиспецифические антитела

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антиген-связывающие домены, специфические по отношению к более чем одному целевому полипептиду. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной связи или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другие антитела или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, при этом одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий GITR, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению ко второму антигену. Связывающее GITR плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, изложенных в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее GITR плечо связывает человеческий GITR и блокирует связывание GITRL с GITR. Согласно другим вариантам осуществления связывающее GITR плечо связывает человеческий GITR, но не блокирует связывание GITRL с GITR. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее GITR плечо связывает человеческий GITR и активирует передачу сигнала GITR. Согласно другим вариантам осуществления связывающее GITR плечо блокирует опосредованную GITRL стимуляцию рецептора. Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антителам, при этом одно плечо антитела связывает первый эпитоп человеческого GITR, а другое плечо указанного антитела связывает второй отличный эпитоп человеческого GITR.

Типичный формат биспецифического антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого C_{H3} домена иммуноглобулина (Ig) и второ-

го C_{H3} домена Ig, при этом первый и второй C_{H3} домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой и при этом по меньшей мере отличие одной аминокислоты уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом без аминокислотного отличия. Согласно одному варианту осуществления первый C_{H3} домен Ig связывает белок А, а второй C_{H3} домен Ig содержит мутацию, которая снижает или отменяет связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзона IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Другие модификации, которые могут находиться во втором C_{H3}, включают в себя D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Вариации формата биспецифического антитела, описанные выше, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Другие типичные биспецифические форматы, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают в себя без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадруму, "выступы во впадины", общую легкую цепь (например, общую легкую цепь по принципу "выступы во впадины" и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, "лейциновые застёжки", Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (см., например, публикацию Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и приведенные в ней ссылки для обзора изложенных выше форматов). Биспецифические антитела также можно конструировать с использованием конъюгации пептида/нуклеиновой кислоты, например, когда неприродные аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью используют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем за счет самосборки образуют мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. Epub: Dec. 4, 2012).

Терапевтический состав и введение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела против GITR или их антиген-связывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением составляют с подходящими носителями, вспомогательными средствами и другими средствами, обеспечивают подходящие перенос, доставку, переносимость т.п. Множество подходящих составов можно найти в сборнике, известном всем фармацевтическим химикам, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбируемые пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимого больному, может варьировать в зависимости от возраста и размера больного, целевого заболевания, состояния, пути введения и т.п. Предпочтительную дозу, как правило, вычисляют согласно массе тела или площади поверхности тела. Для взрослого больного может быть полезно внутривенное введение антитела в соответствии с настоящим изобретением, как правило, при однократной дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и длительность лечения можно регулировать. Эффективные дозировки и схемы введения антител против GITR могут быть определены эмпирически; например, прогресс больного можно контролировать путем периодического оценивания и соответственно регулировать дозу. Более того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в уровне техники способов (например, Morgenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 5:1351).

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, например, инкапсуляция в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают в себя без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым подходящим путем, например при помощи инфузии или инъекции ударной дозы вещества, посредством абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки или тонкого кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной

доставки, то при доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением с легкостью можно применять устройство для доставки по типу шприц-ручка. Такое устройство для доставки по типу шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручка обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и поместить новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприц-ручка затем можно повторно использовать. В случае одноразового устройства для доставки сменный картридж отсутствует. Вернее, одноразовое устройство для доставки по типу шприц-ручка заполнено фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре устройства. После удаления из резервуара фармацевтической композиции пустое устройство выбрасывают.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением применяют разнообразные многоразовые шприц-ручки и автоинжекторные устройства для доставки. Примеры включают в себя без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly и Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany) среди прочих. Примеры одноразовых устройств для доставки по типу шприц-ручка, применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжекторное устройство SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL) среди прочих.

В некоторых ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления можно использовать насос (см. Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Согласно другому варианту осуществления можно использовать полимерные материалы; см., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Согласно следующему варианту осуществления систему контролируемого высвобождения можно помещать вблизи цели композиции, в этом случае требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы контролируемого высвобождения рассмотрены в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривенных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты можно изготавливать общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты можно изготавливать, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций можно назвать, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу, другие вспомогательные вещества и т.д., которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное средство (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)) и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в сочетании с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленный таким образом инъекционный препарат предпочтительно заливать в подходящую ампулу.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, изготавливают в лекарственных формах, стандартная доза которых соответствует дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося указанного выше антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительным является то, что указанное выше антитело составляет от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антител

Настоящее изобретение относится к способам, предусматривающим введение субъекту при необходимости этого терапевтической композиции, содержащей антитело против G1TR (например, антитело против G1TR, содержащее любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, изложенных в табл. 1 в настоящем документе). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител против G1TR,

их антиген-связывающих фрагментов или ADC, раскрываемых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением являются применимыми, *inter alia*, для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью GITR или опосредованного таковой, или излечиваемого путем блокирования взаимодействия между GITR и GITRL и/или путем ингибирования или стимулирования активности и/или передачи сигнала GITR. Например, антитела и антиген-связывающие фрагменты в соответствии с настоящим раскрытием могут быть использованы для лечения иммунных и пролиферативных заболеваний или нарушений, например рака, путем модуляции иммунного ответа посредством, например, активации GITR.

Антитела и антиген-связывающие фрагменты в соответствии с настоящим раскрытием могут быть использованы для лечения заболевания или нарушения путем усиления иммунного ответа. Настоящее раскрытие относится к способам модуляции противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, предусматривающим введение субъекту антитела против GITR или антиген-связывающего фрагмента, описываемых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент снижает супрессивную активность эффекторных Т-клеток с помощью регуляторных Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент в соответствии с настоящим раскрытием повышает благоприятное внутриопухолевое отношение эффекторных Т-клеток/регуляторных Т-клеток для терапевтической пользы. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент в соответствии с настоящим раскрытием обеспечивает выживание Т-клеток.

Типичные заболевания или нарушения, которые можно лечить антителами и антиген-связывающими фрагментами, включают в себя иммунные и пролиферативные заболевания или нарушения, например рак. Антитела и антиген-связывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для лечения первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и его оболочках, ротоглотке, легком и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужских и женских репродуктивных органах, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, а также специальных сенсорных органах, таких как глаз. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и антиген-связывающие фрагменты в соответствии с настоящим раскрытием используют для лечения солидных или переносимых кровью опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием используют для лечения одного или нескольких из следующих раковых заболеваний: почечноклеточная карцинома, карцинома поджелудочной железы, рак области головы и шеи, рак предстательной железы, злокачественная глиома, остеосаркома, рак толстой и прямой кишки, рак желудка (например, рак желудка с амплификацией MET), злокачественная мезотелиома, множественная миелома, рак яичника, рак шейки, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, синовиальная саркома, рак щитовидной железы, рак молочной железы, меланома, рак яичка, почки, пищевода, рак матки, эндометриальный рак или рак печени.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения аутоиммунного заболевания, в том числе без ограничения гнездной алопеции, аутоиммунного гепатита, целиакии, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, воспалительного заболевания кишечника, воспалительных миопатий, множественного склероза, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, витилиго, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунной уртикарии, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, болезни Крона, сахарного диабета I типа, эозинофильного фасциита, эозинофильного энтерогастрита, синдрома Гудпасчера, миастении гравис, псориазического артрита, ревматической лихорадки, язвенного колита, васкулита и гранулематоза Вегенера.

В контексте способов лечения, описываемых в настоящем документе, антитело против GITR может быть введено как монотерапия (т.е. как единственное терапевтическое средство) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описываются где-либо еще в настоящем документе).

Комбинированные терапевтические средства и составы

В настоящем документе также представлены комбинированные терапевтические средства с использованием антитела против GITR в соответствии с настоящим раскрытием и любого дополнительного терапевтического средства, которое может быть успешно объединено с антителом в соответствии с настоящим раскрытием или его антиген-связывающим фрагментом.

Настоящее изобретение относится к композициям и терапевтическим составам, содержащим любое из антител против GITR, описываемых в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и к способам лечения, предусматривающим введение таких комбинаций субъектам при необходимости этого.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть объединены синергически с одним или несколькими противораковыми лекарственными средствами или терапией, используемой для лече-

ния рака, в том числе, например, почечноклеточной карциномы, рака толстой и прямой кишки, мультиформной глиобластомы, плоскоклеточной карциномы области головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого, рака толстой кишки, рака яичника, аденокарциномы, рака предстательной железы, глиомы и меланомы. В настоящем документе предусматривается применение антител против GITR в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с иммуностимуляторными и/или иммуноподдерживающими терапевтическими средствами для подавления роста опухоли и/или увеличения выживаемости раковых больных. Иммуностимуляторные терапевтические средства включают в себя прямые иммуностимуляторные терапевтические средства для усиления активности иммунных клеток либо за счет "ослабления тормоза" в отношении супрессированных иммунных клеток, либо за счет "выжимания газа" для активации иммунного ответа. Примеры включают в себя нацеливание на другие рецепторы контрольных точек, вакцинацию и адъюванты. Иммуноподдерживающие методы могут усиливать антигенность опухоли путем обеспечения иммуногенной клеточной смерти, воспаления или других косвенных эффектов, которые способствуют противоопухолевому иммунному ответу. Примеры включают в себя радиационную терапию, химиотерапию, ангиогенные средства и хирургическое вмешательство.

Настоящее раскрытие относится к способам модуляции противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, предусматривающим введение субъекту антитела против GITR в комбинации с одним или несколькими агонистическими антителами против активирующих рецепторов и одним или несколькими блокирующими антителами против ингибиторных рецепторов, которые усиливают Т-клеточную стимуляцию для обеспечения разрушения опухоли.

Настоящее раскрытие относится к способам модуляции противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, предусматривающим введение субъекту антитела против GITR или антиген-связывающего фрагмента, описываемого в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими выделенными антителами или их антиген-связывающими фрагментами, которые связывается со вторым активирующим Т-клетки рецептором (т.е. отличным от GITR). Согласно некоторым вариантам осуществления вторым активирующим Т-клетки рецептором является CD28, OX40, CD137, CD27 или VEM. Настоящее раскрытие также относится к составам, содержащим антитело против GITR или его антиген-связывающий фрагмент, представленные в настоящем документе, и антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые связываются с указанным вторым активирующим Т-клетки рецептором.

Согласно различным вариантам осуществления одно или несколько антител в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в комбинации с антителом против PD-L1, антителом против PD-1 (например, ниволумабом), ингибитором LAG-3, ингибитором CTLA-4 (например, ипилиумабом), ингибитором TIM3, ингибитором BTLA, ингибитором TIGIT, ингибитором CD47, антагонистом другого Т-клеточного совместного ингибитора или лиганда (например, антителом против CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонистом фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, "VEGF-Трап", таким как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF белок слияния, упомянутый в патенте США № 7087411, или антителом против VEGF или его антиген-связывающим фрагментом (например, бевацизумабом или ранибизумабом) или низкомолекулярным ингибитором киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорafenиб или пазопаниб)), ингибитором Ang2 (например, несвакумабом), ингибитором трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотинибом, цетуксимабом), агонистом к костимулирующему рецептору (например, агонистом к индуцированному глюкокортикоидом родственному TNFR белку), антителом к опухоль-специфическому антигену (например, CA9, CA125, ассоциированным с меланомой антигеном 3 (MAGE3), карциноэмбриональным антигеном (CEA), виментином, tumor-M2-ПК, специфическим по отношению к предстательной железе антигеном (PSA), муцином-1, MART-1 и CA19-9), вакциной (например, бациллой Кальмета-Герена, противораковой вакциной), адъювантом для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором), биспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом CD3xCD20, биспецифическим антителом PSMAxCD3), цитотоксином, химиотерапевтическим средством (например, дакарбазином, темозоломидом, циклофосфамидом, доцетакселом, доксорубицином, даунорубицином, цисплатином, карбоплатином, гемцитабином, метотрексатом, митоксантроном, оксалиплатином, паклитакселом и винкристином), циклофосфамидом, радиационной терапией, ингибитором IL-6R (например, сарилумабом), ингибитором IL-4R (например, дупилумабом), ингибитором IL-10, цитокином, таким как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгатом антитела и лекарственного средства (ADC) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC), противовоспалительным лекарственным средством (например, кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), пищевыми добавками, такими как антиоксиданты, или любой паллиативной помощью для лечения рака. Согласно определенным вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением можно использовать в комбинации с противораковыми вакцинами, в том числе с вакцинами на основе дендритных клеток, онколитическими вирусами, вакцинами на основе опухолевых клеток и т.д., для усиления противоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые можно использовать в комбинации с антителами против GITR в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя вакцину MAGE3 для меланомы и рака мочевого пузыря, вак-

цину MUC1 для рака молочной железы, EGFRv3 (например, Rindoperimut) для рака головного мозга (в том числе мультиформной глиобластомы) или ALVAC-CEA (для CEA+ раковых заболеваний).

Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько антител против GITR, описываемых в настоящем документе, вводят в комбинации с одним или несколькими антителами против PD1, в том числе без ограничения описываемыми в патентной публикации США № 2015/0203579, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно некоторым вариантам осуществления антителом против GITR является H1H14536P2 или H2aM14536P2. Согласно некоторым вариантам осуществления антителом против GITR является REGN 2810 (также известное как H4H7798N, раскрываемое в патентной публикации США № 2015/0203579), пембролизумаб или ниволумаб.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в комбинации с радиационной терапией в способах получения длительных стойких противоопухолевых ответов и/или усиления выживаемости больных раком. Согласно определенным вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением можно вводить до, одновременно или после введения радиационной терапии больному раком. Например, радиационную терапию можно вводить за одну или несколько доз на опухолевые поражения с последующим введением одной или нескольких доз антител против GITR в соответствии с настоящим изобретением. Согласно определенным вариантам осуществления радиационную терапию можно вводить локально на опухолевое поражение для усиления локальной иммуногенности опухоли больного (адьювантное облучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (разрушающее облучение) с последующим системным введением антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением. Например, интракраниальное облучение можно вводить больному раком головного мозга (например, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением. Согласно определенным вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в комбинации с радиационной терапией и химиотерапевтическим средством (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в комбинации с одним или несколькими противовирусными лекарственными средствами для лечения хронической вирусной инфекции, вызываемой LCMV, HIV, HPV, HBV или HCV. Примеры противовирусных лекарственных средств включают в себя без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренз, кобицистат, тенофовир, рилпивирин и кортикостероиды. Согласно определенным вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в комбинации с ингибитором LAG3, ингибитором CTLA-4 или любым антагонистом другого T-клеточного совместного ингибитора для лечения хронической вирусной инфекции.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением могут быть объединены с антителом против Fc-рецептора на иммунных клетках для лечения аутоиммунного заболевания. Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации с антителом или антиген-связывающим белком, нацеленным на антиген, специфический для аутоиммунной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации с антителом или антиген-связывающим белком, нацеленными на T-клеточный рецептор или B-клеточный рецептор, в том числе без ограничения Fc α (например, CD89), Fc-гамма (например, CD64, CD32, CD16a и CD16b), CD19 и т.д. Антитела и их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением можно использовать в комбинации с любым лекарственным средством или терапией, известными в уровне техники (например, кортикостероиды и другие иммунодепрессанты), для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, в том числе без ограничения гнездной алопеции, аутоиммунного гепатита, целиакии, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, воспалительного заболевания кишечника, воспалительных миопатий, рассеянного склероза, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, витилиго, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунной крапивницы, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, болезни Крона, сахарного диабета I типа, эозинофильного фасциита, эозинофильного энтерогастрита, синдрома Гудпасчера, миастении гравис, псориазического артрита, ревматической лихорадки, язвенного колита, васкулита и гранулематоза Вегенера.

Настоящее раскрытие также относится к способам модуляции противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, предусматривающим введение субъекту антитела против GITR или антиген-связывающего фрагмента, описываемого в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими выделенными антителами или их антиген-связывающими фрагментами, которые связываются с ингибирующим T-клетки рецептором. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующий T-клетки рецептор представляет собой CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA или LAG-3. Настоящее раскрытие также относится к составам, содержащим антитело против GITR или его антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем документе, и антитело или антиген-связывающий фрагмент, ко-

торые связываются с указанным ингибирующим T-клетки рецептором.

Настоящее раскрытие также относится к способам лечения рака путем введения антитела или его антиген-связывающего фрагмента или состава, описываемого в настоящем документе, субъекту совместно с радиацией или химиотерапией.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением составляют совместно с и/или вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из антагониста EGFR (например, антитела против EGFR (например, цетуксимаба или пинитумумаба) или низкомолекулярного ингибитора EGFR (например, гефитиниба или эрлотиниба)), антагонистом другого представителя семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антитела против ErbB2 (например, тарстузумаба или T-DM1 {KADCYLA®}), против ErbB3 или против ErbB4 или низкомолекулярного ингибитора активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагониста EGFRvIII (например, антитела, которое специфически связывает EGFRvIII), антагониста cMET (например, антитела против cMET), антагониста IGF1R (например, антитела против IGF1R), ингибитора B-raf (например, вемурафениба, сарфениба, GDC-0879, PLX-4720), ингибитора PDGFR- α (например, антитела против PDGFR- α), ингибитора PDGFR- β (например, антитела против PDGFR- β или низкомолекулярного ингибитора киназы, такого как, например, иматиниба мезилат или сунитиниба малат), ингибитора лиганда PDGF (например, антитела против PDGF-A, -B, -C или -D, аптамера, siRNA и т.д.), антагониста VEGF (например, VEGF-Тгар, такого как афлиберцепт, см., например, патент США № 7087411 (также называемого в настоящем документе "ингибирующим VEGF белком слияния"), антитела против VEGF (например, бевацизумаба низкомолекулярного ингибитора киназы рецептора VEGF (например, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)), антагониста DLL4 (например, антитела против DLL4, раскрываемого в патентном документе США № 2009/0142354, такого как REGN421), антагониста Ang2 (например, антитела против Ang2, раскрываемого в патентном документе США № 2011/0027286, такого как H1H685P), антагониста FOLH1 (например, антитела против FOLH1), антагониста STEAP1 или STEAP2 (например, антитела против STEAP1 или антитела против STEAP2), антагониста Tmprss2 (например, антитела против Tmprss2), антагониста MSLN (например, антитела против MSLN), антагониста CA9 (например, антитела против CA9), антагониста уроплакина (например, антитела против уроплакина (например, антитела против UPK3A)), антагониста MUC16 (например, антитела против MUC16), антагониста антигена Tn (например, антитела против Tn), антагониста CLEC12A (например, антитела против CLEC12A), антагониста TNFRSF17 (например, антитела против TNFRSF17), антагониста LGR5 (например, антитела против LGR5), одновалентного антагониста CD20 (например, одновалентного антитела против CD20, такого как ритуксимаб) и т.д. Другие средства, которые могут быть эффективно введены в комбинации с антителами в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокина, в том числе низкомолекулярные ингибиторы цитокина и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с соответствующими им рецепторами.

Настоящее изобретение относится к композициям и терапевтическим составам, содержащим любые антитела против GITR, описываемые в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими химиотерапевтическими средствами. Примеры химиотерапевтических средств включают в себя алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (Сутохан™); алкилсульфонаты, такие как бусульфид, импросульфид и пипосульфид; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленмины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфорамид и триметиллоломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднемустин, трифосфамид, урамустин; нитрозомочевины такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзорубин, идарубин, марселломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; анти-метаболиты, такие как метотрексат, иринотекан, лейковорин и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калюстерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, естолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средства, компенсирующие недостаток фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиний ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гид-

роксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; декарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепу; таксаны, например, паклитаксел (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доцетаксел (Taxotere™, Aventis Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые аналоги, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. Также включены в это определение антигормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, например антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидроксирамноксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

Антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением также можно вводить и/или составлять совместно в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами COX, кардиопротекторами, хелаторами металлов, IFN-гамма и/или NSAID.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы), например любое из перечисленных выше средств их производных, может быть введен до, одновременно или сразу же после введения антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением (для целей настоящего раскрытия такие режимы введения считают введением антитела против G1TR "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антитело против G1TR в соответствии с настоящим изобретением составляют совместно с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, описываемых где-либо еще в настоящем документе.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) может быть введен субъекту перед введением антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением. Например, первый компонент может рассматриваться как введенный "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю, за 72 ч, за 60 ч, за 48 ч, за 36 ч, за 24 ч, за 12 ч, за 6 ч, за 5 ч, за 4 ч, за 3 ч, за 2 ч, за 1 ч, за 30 мин, за 15 мин, за 10 мин, за 5 мин или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) может быть введен субъекту после введения антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением. Например, первый компонент может рассматриваться как введенный "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, 5 мин после, 10 мин после, 15 мин после, 30 мин после, 1 ч после, 2 ч после, 3 ч после, 4 ч после, 5 ч после, 6 ч после, 12 ч после, 24 ч после, 36 ч после, 48 ч после, 60 ч после, 72 ч после введения второго компонента. Согласно следующим вариантам осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) может быть введен субъекту одновременно с введением антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением. "Одновременное" введение для целей настоящего изобретения включает в себя, например, введение антитела против G1TR и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме (например, совместно составленные) или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 мин или меньше друг после друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждая лекарственная форма может быть введена тем же путем (например, и антитело против G1TR, и дополнительный терапевтически активный компонент могут быть введены внутривенно, подкожно и т.д.); в качестве альтернативы каждая лекарственная форма может быть введена разными путями (например, антитело против G1TR может быть введено внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен подкожно). В любом случае введение компонентов в одной лекарственной форме, в разных лекарственных формах одним и тем же путем или в разных лекарственных формах разными путями считают "одновременным введением" для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего раскрытия введение антитела против G1TR "перед", "одновременно" или "после" (как данные термины определены выше в настоящем документе) в отношении введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антитела против G1TR "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антитело против G1TR в соответствии с настоящим изобретением составляют совместно с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, как описывается где-либо в настоящем документе, с использованием ряда комбинированных лекарственных форм.

Согласно типичным вариантам осуществления, в которых антитело против GITR в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации с антагонистом VEGF (например, белком-ловушкой для VEGF, таким как афлиберцепт), в том числе вводят совместные составы, содержащие антитело против GITR и антагонист VEGF, отдельные компоненты могут быть введены субъекту и/или совместно составлены с использованием ряда комбинированных лекарственных форм. Например, антитело против GITR может быть введено субъекту и/или может содержаться в совместном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 и 10,0 мг; и антагонист VEGF (например, белок-ловушка для VEGF, такой как афлиберцепт) может быть введен субъекту и/или может содержаться в совместном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 и 3,0 мг.

Комбинации/совместные составы могут быть введены субъекту согласно любому из режимов введения, раскрываемых где-либо еще в настоящем документе, в том числе, например, дважды в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев и т.д.

Режимы введения

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела против GITR (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела против GITR и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упоминаемых в настоящем документе) могут быть введены субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно настоящему аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением. Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела против GITR вводят субъекту в разные моменты времени, например в разные дни, отделенные заранее определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение относится к способам, которые предусматривают последовательное введение больному одной начальной дозы антитела против GITR с последующей одной или несколькими вторичными дозами антитела против GITR и необязательно с последующей одной или несколькими третичными дозами антитела против GITR.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (она также называется "исходной дозой"; "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы могут все содержать одинаковое количество антитела против GITR, но, как правило, могут отличаться друг от друга в отношении частоты введения. Тем не менее, согласно определенным вариантам осуществления количество антитела против GITR, содержащееся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, варьирует (например, его повышают или понижают при необходимости) в течение курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале режима лечения в качестве "насыщающих доз" с последующим введением последующих доз, которые вводят менее часто (например, "поддерживающие дозы").

Согласно некоторым типичным вариантам осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 2^{1/2}, 25, 2^{1/2}, 26, 2^{1/2} или более) недель непосредственно после предыдущей дозы. Используемая в настоящем документе фраза "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антитела против GITR, которую вводят больному перед введением каждой последующей дозы в последовательности без каких-либо промежуточных доз.

Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения могут предусматривать введение больному любого количества вторичных и/или третичных доз антитела против GITR. Например, согласно определенным вариантам осуществления больному вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) вторичных доз вводят больному. Подобным образом, согласно определенным вариантам осуществления больному вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичных доз вводят больному. Режим введения может проводиться неограниченно на протяжении жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение больше не будет терапевтически необходимым или выгодным.

Согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить больному через 1-2 недели или 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Подобным образом, согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что другие третич-

ные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить больному через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения частота, с которой вторичную и/или третичную дозы вводят больному, может варьировать в течение курса режима лечения. Частоту введения в течение курса лечения также может откорректировать лечащий врач в зависимости от потребностей отдельного больного после клинического эксперимента.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены режимы введения, в которых 2-6 насыщающие дозы вводят больному с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т.д.) с последующим введением двух или более поддерживающих доз больному с меньшей частотой. Например, согласно данному аспекту настоящего изобретения, если насыщающие дозы вводят с частотой, составляющей один раз в месяц, затем поддерживающие дозы можно вводить больному один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца и т.д.

Диагностическое применение антител

Антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением также можно использовать для обнаружения и/или измерения G1TR или G1TR-экспрессирующих клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело против G1TR или его фрагмент может быть использовано для диагностики состояния или заболевания, характеризуемого аномальной экспрессией (например, наэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствующей экспрессией и т.д.) G1TR. Иллюстративные диагностические анализы для G1TR могут предусматривать, например, приведение в контакт образца, полученного от больного, с антителом против G1TR в соответствии с настоящим изобретением, при этом антитело против G1TR является меченым с помощью обнаруживаемой метки или репортерной. В качестве альтернативы немеченое антитело против G1TR можно использовать в диагностических применениях в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе является меченым обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеин или родамин; или такой фермент как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Специфические иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения G1TR в образце, включают в себя твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), Immuno-PET (например, ^{89}Zr , ^{64}Cu и т.д.) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах G1TR в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя любой образец ткани или жидкости, получаемый от больного, который содержит обнаруживаемые количества белка G1TR или его фрагментов, при нормальных или патологических состояниях. Как правило, уровни G1TR в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием или состоянием, ассоциированным с аномальными содержаниями или активностью G1TR) будут измеряться, чтобы изначально установить исходное или стандартное содержание G1TR. Это исходное содержание G1TR затем можно сравнить с содержаниями G1TR, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, у которых подозревают связанное с G1TR заболевание или состояние.

Примеры

Следующие примеры предложены для того, чтобы обеспечить специалистов в данной области полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением, и не ограничены объемом того, что авторы настоящего изобретения относят к своему изобретению. Были сделаны попытки обеспечить точность в отношении использованных чисел (например, количества, температура и т.д.), но следует принимать в расчет некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса означает среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким атмосферному.

Пример 1. Создание антител против G1TR.

Антитела против G1TR получали путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. рекомбинантной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и каппа-легкой цепей человеческого иммуноглобулина) с помощью иммуногена, содержащего растворимый димерный эктодомен человеческого G1TR. Иммунный ответ с образованием антител контролировали с помощью G1TR-специфического иммуноанализа. Некоторые полностью человеческие антитела против G1TR выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с миеломными клетками, как описывается в патентном документе США № 2007/0280945 A1.

Некоторые биологические свойства типичных антител против G1TR, создаваемых согласно способам данного примера, подробно описываются в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот вариабельной области тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 изложены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител против G1TR в соответствии с настоящим изобрете-

нием. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот изложены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	DR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H14474P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H14486P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H14491P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H14493P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H14495P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H14503P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H14512P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H14520P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H14523P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H14524P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H14469P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H14470P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H14475P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H14476P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H14508P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H14516P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4H14521P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4H14525P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4H14528P	290	292	294	296	298	300	302	304
H4H14530P	306	308	310	312	314	316	318	320
H4H14531P2	322	324	326	328	402	404	406	408
H4H14532P2	330	332	334	336	402	404	406	408
H4H14536P2	338	340	342	344	402	404	406	408
H4H14539P2	346	348	350	352	402	404	406	408
H4H14541P2	354	356	358	360	402	404	406	408
H4H15736P2	362	364	366	368	402	404	406	408
H4H15740P2	370	372	374	376	402	404	406	408
H4H15744P2	378	380	382	384	402	404	406	408
H4H15745P2	386	388	390	392	402	404	406	408
H4H15753P2	394	396	398	400	402	404	406	408

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H14474P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H14486P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H14491P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H14493P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H14495P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H14503P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H14512P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H14520P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H14523P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H14524P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H14469P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H14470P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H14475P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H14476P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H14508P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H14516P	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H14521P	257	259	261	263	265	267	269	271
H4H14525P	273	275	277	279	281	283	285	287
H4H14528P	289	291	293	295	297	299	301	303
H4H14530P	305	307	309	311	313	315	317	319
H4H14531P2	321	323	325	327	401	403	405	407
H4H14532P2	329	331	333	335	401	403	405	407
H4H14536P2	337	339	341	343	401	403	405	407
H4H14539P2	345	347	349	351	401	403	405	407
H4H14541P2	353	355	357	359	401	403	405	407
H4H15736P2	361	363	365	367	401	403	405	407
H4H15740P2	369	371	373	375	401	403	405	407
H4H15744P2	377	379	381	383	401	403	405	407
H4H15745P2	385	387	389	391	401	403	405	407
H4H15753P2	393	395	397	399	401	403	405	407

Антитела, как правило, в настоящем документе называют согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, "H1H", "H4H" и т.д.), затем цифровой идентификатор (например, "14493", "14495" и т.д.), затем суффикс "P" или "P2", как показано в табл. 1 и 2. Таким образом, согласно данной номенклатуре антитело может быть названо в настоящем документе, например, как "H1H14486P", "H4H14531P2" и т.д. Приставки H1H и H4H в обозначениях антител, используемых в настоящем документе, указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H1H" имеет Fc человеческого IgG1, антитело "H4H" имеет Fc человеческую IgG4, а H2M имеет Fc мышинового IgG2 (все переменные области являются полностью человеческими, как обозначено первой "H" в обозначении антитела). Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc, но в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые идентифицируют цифровыми идентификаторами, показанными в табл. 1 и 2, останутся теми же, и предполагают, что свойства связывания будут идентичными или по сути подобными, несмотря на природу Fc-домена.

Контрольные конструкции, используемые в следующих примерах

Контрольные конструкции включали в следующие эксперименты с целью сравнения. Контрольное Ab I против GITR: гибридома мышинового антитела против человеческого GITR с переменными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющими аминокислотные последовательности соответствующих доменов "клона 6C8", как изложено в WO 2006/105021 A2; полученное с константными областями mIgG1 и mIgG2a в следующих примерах; и контрольное Ab II против GITR: человеческое антитело против GITR с переменными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющими аминокислотные последовательности соответствующих доменов "36E5", как изложено в патенте США № 8709424 B2.

Пример 3. Полученные с помощью поверхностного плазменного резонанса аффинности связывания и кинетические константы человеческих моноклональных антител против TNFRSF18 (GITR).

Аффинности связывания и кинетические константы человеческих антител против GITR определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore 4000 или T-200) при 37°C (табл. 3). Антитела, экспрессируемые как человеческое IgG1 или IgG4 (т.е. обозначения "H1H" или "H4H"), захватывали на сенсорную поверхность CM5 Biacore, покрытую мышиным антителом против человеческого Fc (формат mAb-захвата) и растворимым мономером (человеческим (h) GITR.mmh; SEQ ID NO: 409 и Macaca fascicularis (mf) GITR.mmh; SEQ ID NO: 412) или димером (hGITR.hFc; SEQ ID NO: 411 и hGITRmFc; SEQ ID NO: 410). Белки GITR вводили на сенсорную поверхность со скоростью потока 30 мкг/мин. Все исследования связывания на Biacore выполняли в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. Surfactant P20 (подвижный буфер HBS-ET). Ассоциацию антитело-реагент наблюдали в течение 4 мин, тогда как диссоциацию в подвижном буфере HBS-ET (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% (об./об.) Surfactant P20, pH 7,4) наблюдали в течение 10 мин. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем подбора сенсограмм в режиме реального времени для 1:1 модели связывания с использованием программного обеспечения Scrubber 2.0c для подбора кривой. Константы равновесия диссоциации связывания (K_D) и диссоциативные периоды полужизни ($t_{1/2}$) вычисляли из кинетических констант скорости как: $K_D[M] = k_d/k_a$; и $t_{1/2}$ (минуты) = $(\ln 2)/(60 * k_d)$. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Определяемые с помощью Biacore аффинности связывания mAb против человеческой Fc при 37°C

Антитело	Связывание при 37°C/формат захвата антитела				
	Аналит	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_D (моль)	$t_{1/2}$ (мин.)
H1H14503P	hGITR.mmh	5,32E+05	7,39E-04	1,39E-09	15,6
	hGITR.mFc	1,12E+06	1,54E-04	1,37E-10	75,0
	mfGITR.mmh	2,68E+05	5,60E-03	2,09E-08	2,1
H1H14474P	hGITR.mmh	5,91E+05	1,16E-03	1,96E-09	9,9
	hGITR.mFc	1,21E+06	1,30E-04	1,07E-10	89,2
	mfGITR.mmh	3,39E+05	9,51E-03	2,80E-08	1,2
H1H14495P	hGITR.mmh	5,17E+05	1,27E-03	2,45E-09	9,1
	hGITR.mFc	1,14E+06	1,10E-04	9,68E-11	105,0
	mfGITR.mmh	2,96E+05	7,23E-03	2,45E-08	1,6
H1H14486P	hGITR.mmh	4,39E+05	1,23E-03	2,79E-09	9,4
	hGITR.mFc	9,65E+05	1,53E-04	1,59E-10	75,5
	mfGITR.mmh	1,37E+05	1,66E-02	1,22E-07	0,7

H1H14524P	hGITR.mmh	4,05E+05	1,47E-03	3,62E-09	7,9
	hGITR.mFc	9,22E+05	1,35E-04	1,46E-10	85,6
	mfGITR.mmh	1,20E+05	1,89E-02	1,58E-07	0,6
H4H14530P	hGITR.mmh	2,72E+05	1,38E-03	5,06E-09	8,4
	hGITR.mFc	2,93E+05	1,85E-04	6,30E-10	62,6
	mfGITR.mmh	2,40E+05	6,11E-04	2,55E-09	18,9
H1H14491P	hGITR.mmh	3,19E+05	1,62E-03	5,06E-09	7,2
	hGITR.mFc	8,42E+05	1,69E-04	2,01E-10	68,3
	mfGITR.mmh	1,18E+05	8,89E-03	7,53E-08	1,3
H1H14523P	hGITR.mmh	2,16E+05	1,86E-03	8,63E-09	6,2
	hGITR.mFc	5,55E+05	1,20E-04	2,16E-10	96,3
	mfGITR.mmh	1,23E+05	1,09E-02	8,85E-08	1,1
H1H14493P	hGITR.mmh	1,86E+05	2,50E-03	1,34E-08	4,6
	hGITR.mFc	5,24E+05	1,91E-04	3,65E-10	60,4
	mfGITR.mmh	1,00E+04	1,40E-02	1,40E-06	0,8
H4H14532P2	hGITR.mmh	3,48E+05	6,45E-03	1,85E-08	1,8
	hGITR.mFc	7,20E+05	2,69E-04	3,73E-10	42,9
	mfGITR.mmh	2,60E+05	6,48E-03	2,49E-08	1,8
H4H14521P	hGITR.mmh	3,45E+05	7,84E-03	2,27E-08	1,5
	hGITR.mFc	1,23E+06	4,79E-04	3,89E-10	24,1
	mfGITR.mmh	1,66E+05	3,34E-03	2,01E-08	3,5
H4H14536P2	hGITR.mmh	4,24E+05	9,76E-03	2,30E-08	1,2
	hGITR.mFc	1,26E+06	2,19E-04	1,73E-10	52,7
	mfGITR.mmh	1,04E+05	1,47E-02	1,42E-07	0,8
H4H14476P	hGITR.mmh	3,92E+05	1,23E-02	3,14E-08	0,9
	hGITR.mFc	9,06E+05	2,69E-04	2,97E-10	42,9
	mfGITR.mmh	1,91E+05	1,07E-02	5,58E-08	1,1
H4H14516P	hGITR.mmh	2,25E+05	7,38E-03	3,27E-08	1,6
	hGITR.mFc	1,68E+06	1,81E-03	1,08E-09	6,4
	mfGITR.mmh	1,90E+05	1,12E-02	5,87E-08	1,0
H4H14508P	hGITR.mmh	2,55E+05	9,35E-03	3,66E-08	1,2
	hGITR.mFc	1,21E+06	7,19E-04	5,97E-10	16,1
	mfGITR.mmh	1,29E+05	5,07E-03	3,93E-08	2,3
H4H14469P	hGITR.mmh	2,84E+05	1,22E-02	4,30E-08	0,9
	hGITR.mFc	1,20E+06	4,01E-04	3,35E-10	28,8
	mfGITR.mmh	5,91E+04	2,43E-03	4,11E-08	4,7
H4H14475P	hGITR.mmh	3,07E+05	1,40E-02	4,57E-08	0,8
	hGITR.mFc	1,60E+06	1,35E-03	8,47E-10	8,5
	mfGITR.mmh	1,83E+05	7,65E-03	4,17E-08	1,5
H4H14528P	hGITR.mmh	1,02E+05	5,23E-03	5,13E-08	2,2
	hGITR.mFc	1,58E+06	1,77E-03	1,12E-09	6,5
	mfGITR.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H14525P	hGITR.mmh	3,17E+05	1,66E-02	5,24E-08	0,7
	hGITR.mFc	7,91E+05	3,38E-04	4,27E-10	34,2
	mfGITR.mmh	1,33E+05	2,05E-02	1,55E-07	0,6
H1H14520P	hGITR.mmh	2,66E+05	1,67E-02	6,30E-08	0,7
	hGITR.mFc	1,09E+06	5,83E-04	5,37E-10	19,8
	mfGITR.mmh	1,99E+05	1,71E-02	8,59E-08	0,7
H4H14470P	hGITR.mmh	2,21E+05	1,43E-02	6,47E-08	0,8
	hGITR.mFc	9,04E+05	1,04E-03	1,15E-09	11,1
	mfGITR.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H14539P2	hGITR.mmh	2,14E+05	1,77E-02	8,25E-08	0,7
	hGITR.mFc	8,53E+05	4,72E-04	5,54E-10	24,5
	mfGITR.mmh	7,23E+04	1,65E-03	2,28E-08	7,0
Антител против GITR	hGITR.mmh	2,16E+05	2,63E-02	1,22E-07	0,4
	hGITR.hFc	3,82E+05	7,80E-03	2,04E-08	1,5
	mfGITR.mmh	2,18E+05	4,64E-02	2,13E-07	0,2
Антител против GITR	hGITR.mmh	1,94E+05	9,67E-04	4,99E-09	11,9
	hGITR.mFc	1,83E+06	1,73E-03	9,48E-10	6,7
	mfGITR.mmh	2,31E+05	8,63E-03	3,74E-08	1,3

NB = Отсутствие наблюдаемого связывания при используемых условиях

Как показано в табл. 3, все антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением связы-

вались с человеческим GITR, при этом некоторые антитела демонстрировали субнаномолярные аффинности по отношению к димерному белку человеческого GITR. Кроме того, большая часть антител против GITR также демонстрировала перекрестную реактивность по отношению к белку GITR яванского макака. Перекрестную реактивность по отношению к белку GITR грызунов не наблюдали (данные не показаны).

Пример 4. Специфическое и эффективное связывание антител против GITR с клетками, экспрессирующими человеческий GITR.

В данном примере способность антител против GITR специфически связываться с линией экспрессирующих человеческий GITR клеток определяли с использованием выявления на основе электрохемилюминесценции (ECL).

Вкратце, человеческие эмбриональные клетки почки (HEK)-293-D9 стабильно трансфицировали человеческим GITR (аминокислоты M1-V241, № доступа в NCBIINP 004186.1, SEQ ID: 413) с помощью опосредованного Lipofectamine 2000 метода. Трансфектантов отбирали в течение по меньшей мере 2 недель в полной ростовой среде + G418.

Для исследования связывания клеток приблизительно 1×10^5 клеток hGITR/HEK293-D9 или исходных клеток HEK293-D9, которые не экспрессируют человеческий GITR, высевали в 96-луночные планшеты с угольными электродами (MULTI-ARRAY, MSD) в течение 1 ч при 37°C. Сайты неспецифического связывания блокировали с помощью 2% BSA (мас./об.) + PBS в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Затем серийные разбавления антител против GITR, варьирующие от 1,7 пМ до 100 нМ, добавляли в клетки в течение 1 ч при RT. Затем планшеты промывали для удаления несвязанных антител (устройство отмывки планшетов AquaMax2000, MSD Analytical Technologies) и связанные с планшетом антитела выявляли с конъюгированным антителом против каппа-легкой цепи человеческого IgG SULFO-TAG™ (Jackson ImmunoResearch) в течение 1 ч при RT.

После промываний регистрировали люминесцентные сигналы с помощью устройства SECTOR Imager 6000 (MSD). Сигналы прямого связывания (в относительных световых единицах, RLU) анализировали как функцию концентрации антитела и данные подгоняли к сигмоидальной (четырёхпараметрической логистической) модели "доза-ответ" с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. EC₅₀ для связывания клеток hGITR/HEK293-D9, определяемую как концентрацию антитела, при которой выявляется 50% максимального сигнала связывания, определяли для указания эффективности связывания каждого антитела. Регистрировали сигнал, выявляемый со связыванием 100 нМ антитела с экспрессирующими hGITR клетками относительно исходных клеток, как показатель интенсивности и специфичности связывания GITR. Результаты представлены в табл. 4.

Как показано в табл. 4, большинство антител против GITR в соответствии с настоящим изобретением специфически связываются с экспрессирующими человеческий GITR клетками относительно исходных клеток HEK293 с EC₅₀, варьирующими от 210 пМ до 85 нМ. Большинство антител связываются с экспрессирующими человеческий GITR клетками с субнаномолярными значениями EC₅₀. Антитело контрольного изотипа не демонстрировало связывание с экспрессирующими hGITR или исходными клеточными линиями.

Таблица 4. EC₅₀ связывания антитела против GITR и интенсивность связывания при 100 нМ на экспрессирующих человеческий GITR клетках

	Связывания с клетками hGITR/HEK293-D9	Связывания с клетками hGITR/HEK293-D9 (при 100 нМ)	Связывания с клетками HEK293-D9 (при 100 нМ)
Антитело	EC50 (М)	Средний сигнал (RLU)	Средний сигнал (RLU)
H1H14474P	2,80E-10	6230	680
H1H14486P	4,30E-10	5830	280
H1H14491P	4,00E-10	6840	300

H1H14493P	3,00E-10	7220	790
H1H14495P	4,30E-10	6470	340
H1H14503P	2,10E-10	5880	330
H1H14512P	2,50E-10	4620	180
H1H14520P	2,40E-10	6450	1130
H1H14523P	4,00E-10	6350	530
H1H14524P	2,10E-10	5740	500
H4H14469P	2,30E-10	5230	260
H4H14470P	1,40E-09	8390	1580
H4H14475P	8,00E-09	7500	1580
H4H14476P	5,70E-10	8120	1770
H4H14508P	4,50E-10	6870	580
H4H14516P	7,00E-10	10330	2560
H4H14521P	4,30E-10	10080	600
H4H14525P	6,00E-10	8840	1490
H4H14528P	4,50E-10	7310	420
H4H14530P	8,50E-08	4200	520
H4H14532P2	4,30E-10	5740	300
H4H14536P2	3,60E-10	8960	330
H4H14539P2	3,00E-10	4910	300
Контрольное Ab против G1TR II-hIgG1	2,60E-10	13750	10240
Контрольный изотип Ab-hIgG4	NB	750	650

В заключение, данный пример демонстрирует, что антитела против G1TR в соответствии с настоящим изобретением проявляют специфическое и эффективное связывание с экспрессирующими человеческие G1TR клеточными линиями.

Пример 5. Антитела против G1TR являются частичными блокаторами и частичными активаторами в анализе по NF-κB/люциферазному репортеру в присутствии или в отсутствие заякоривания антитела на Fc-гамма R.

В данном примере способность антител против G1TR активировать hG1TR или блокировать опосредуемую лигандом hG1TR (hG1TRL) стимуляцию рецептора в присутствии или в отсутствие заякоривания антителом Fc-гамма-рецепторов (Fc-гамма-R) оценивали с помощью анализов на основе люциферазного репортера.

Вкратце, конструировали клеточную линию Jurkat с подходящим включением hG1TR и NF-κB-зависимого люциферазного репортера (hG1TR/Jurkat/NF-κB-Luc). NF-κB/люциферазный репортер вводили в клетки Jurkat с использованием системы Signal Lenti Reporter (SABiosciences). Лентивирусы, экспрессирующие hG1TR, создавали в HEK293/T17 с использованием Lenti-X Lentiviral Expression System (Clontech). Клетки Jurkat/NF-κB-Luc трансфицировали с экспрессирующим hG1TR лентивирусом путем опосредованной полибренном трансдукции и отбирали на 500 мкг/мл G418 в течение 2 недель. Для исследований заякоривания антитела клетки HEK293 трансдуцировали экспрессирующим Fc-гамма-RI лентивирусом, как описывается выше.

Сначала оценивали активирующие и блокирующие свойства антител против hG1TR в отсутствие заякоривания Fc-гамма-R (незаякоренный формат биоанализа). Приблизительно 4×10^4 клеток Jurkat/NF-κBLuc/hG1TR высевали на протяжении ночи (ON) в покрытые PDL 96-луночные планшеты в OptiMEM + 0,5% FBS.

Для определения активирующей способности антитела клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°C

с серийно разбавленными антителами против hGITR или hGITRL с концентрациями, варьирующими от 0,5 пМ до 100 нМ. Для оценивания блокирования антителом hGITRL опосредованной рецепторной стимуляции клетки предварительно инкубировали в течение 30 мин с серийно разбавленными антителами против hGITR (от 0,5 пМ до 100 нМ) с последующей константной дозой 10 нМ hGITRL в течение 6 ч.

Затем активирующие и блокирующие свойства выбранных антител против hGITR определяли в присутствии заякоривания Fc- α MMa-R (заякоренный формат биоанализа). Подобно указанному выше, $2,5 \times 10^4$ клеток Jurkat/NfkBLuc/hGITR высевали в покрытые PDL 96-луночные планшеты в полную ростовую среду.

Для оценивания активации антител клетки предварительно инкубировали в течение 1 ч при 37°C с серийно разбавленными mAb против hGITR или hGITRL (от 0,5 пМ до 100 нМ). Затем сразу же добавляли 1×10^4 клеток hFc-гамма R1/HEK293 в лунки с последующей 6-часовой инкубацией. Для оценивания блокирования клетки hGITR/Jurkat/NfkBLuc предварительно инкубировали в течение 1 ч с серийно разбавленными антителами против hGITR (от 0,5 пМ до 100 нМ). В лунки добавляли 1×10^4 клеток hFc-R1/HEK293 с последующим добавлением константной дозы 10 нМ hGITRL.

Для биоанализов как заякоренного, так и незаякоренного форматов люциферазную активность измеряли с помощью реагента One Glow (Promega), а относительные световые единицы (RLU) измеряли на люцинометре Victor (Perkin Elmer). Значения EC₅₀/IC₅₀ определяли по четырехпараметрическому логистическому уравнению на основе 12-кривой ответа с использованием GraphPad Prism. Результаты представлены в табл. 5 и табл. 6. Для определения % блокирования исходные RLU (относительные световые единицы) из необработанных лунок вычитали из таковых обработанных лунок и вычисляли процент блокирования согласно следующей формуле: $[100 - (\text{RLU антитела при макс. дозе} / \text{RLU лиганда при константной дозе}) * 100]$. % активации вычисляли согласно следующей формуле: $(\text{нормализованные RLU mAb} / \text{макс. ответ лиганда GITR}) * 100$; нормализованные RLU mAb определяли путем вычитания RLU из необработанных лунок от таковых обработанных лунок. Среднюю кратность активации вычисляли следующим образом: RLU при максимальной дозе антитела/исходные RLU из необработанных лунок.

Таблица 5. Блокирующие и активирующие свойства антител против GITR в отсутствие заякоривания Fc-гамма-R

Антитело	IC ₅₀ (нМ)	% блокирования	EC ₅₀ (нМ)	% активации
H4H14475P	ND	-2	1,0	70
H1H14491P	0,60	90	2,0	60
H4H14521P	3,80	60	0,4	50
H1H14503P	0,60	90	1,4	50
H4H14469P	0,70	90	2,3	50
H4H14516P	2,30	70	0,8	45
H1H14523P	0,90	70	2,5	40
H1H14524P	0,70	80	2,2	40
H4H14528P	3,40	90	1,1	30
H1H14495P	0,70	80	1,3	30

H1H14474P	0,80	80	1,2	30
H4H14508P	0,90	40	1,2	30
H4H14532P2	1,00	90	1,2	30
H1H14486P	1,10	50	1,2	30
H1H14493P	0,60	90	1,2	25
H1H14512P	0,70	100	1,2	20
H4H14525P	1,40	70	1,1	20
H4H14539P2	1,20	30	1,3	20
H4H14536P2	2,00	90	1,1	20
H4H14470P	0,90	80	1,2	20
H4H14476P	2,60	90	1,0	10
H1H14520P	0,90	80	1,1	10
Контрольное Ab против GITR I-mIgG1	0,10	54	1,02	25
Контрольный изотип IgG1	NB	NB	NA	NA
Контрольный изотип IgG4	NB	NB	NA	NA

NB = отсутствие блокирования

NA = отсутствие активации

Как изложено в табл. 5 выше и табл. 6 ниже, тестируемые антитела демонстрировали частичные активирующие и частичные блокирующие свойства в биоанализах как незаякоренного, так и заякоренного форматов. В незаякоренном формате антитела опосредовали стимуляцию рецептора с EC₅₀, варьирующими от 0,4 нМ до 2,5 нМ. Некоторые антитела, такие как H4H14475P и H4H14491P, были мощными активаторами рецептора GITR, демонстрируя процент активации 70 и 60 соответственно. Большинство тестируемых антител также демонстрировали блокирование опосредованной hGITRL стимуляции рецептора с IC₅₀, варьирующими от 0,6 нМ до 3,8 нМ. Некоторые типичные антитела, такие как H1H14512P и H4H14536P2, демонстрировали мощную блокирующую активность 100% и 90% соответственно. H4H14475P, наиболее эффективный активатор, демонстрировало наименьшую активность в анализе блокирования (процент блокирования - 2%).

Таблица 6. Блокирующие и активирующие свойства антител против GITR в присутствии заякоривания Fc-гамма-R

Антитело	IC ₅₀ (нМ)	% блокирования	EC ₅₀ (нМ)	Кратность активации относительно исходного сигнала
H1H14512P	0,10	64	0,02	7,0
H4H14475P	0,20	43	0,04	8,0
H4H14536P2	0,20	73	0,01	5,0
Контрольное Ab против GITR I-mIgG1	0,20	60	0,10	6,0
Контрольное Ab против GITR I-mIgG2a	0,01	74	0,20	5,0
Контрольное Ab против GITR II-hIgG1	0,20	70	0,01	8,0

Выбранные тестируемые антитела в формате заякоривания Fc-гамма-R анализа также демонстрировали диапазон активирующих и блокирующих свойств. H4H14475P, самый сильный активатор в незая-

коренном формате, также эффективно активировало hGITR в заякоренном биоанализе с кратностью активации, на 8,0 превышающей исходный сигнал. Сильные блокаторы в незаякоренном формате блокирования, такие как H1H14512P и H4H14536P2, также демонстрировали эффективное блокирование в заякоренном анализе (% блокирования 60% и 70%).

В заключение, результаты показывают, что антитела против GITR в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют эффективные активирующие GITR свойства, а также способность блокировать опосредованную GITRL стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc-гамма-R в рекомбинантном биоанализе. Типичные антитела, такие как H4H14775P и H4H1536P2, также сохраняют свои активирующие и блокирующие свойства соответственно в присутствии заякоривания Fc-гамма-R.

Пример 6. Антитело против GITR H4H14536P2 демонстрирует мощную активность в анализе пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток в присутствии и в отсутствие заякоривания Fc-гамма-R.

Как описывается выше, антитела против GITR тестировали в рекомбинантном биоанализе по их способности активировать hGITR в присутствии или в отсутствие заякоривания Fc-гамма-рецепторов (Fc-гамма-R). В данном примере эффект заякоривания антитела в отношении активации hGITR оценивали в биоанализе первичной пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток. Система человеческих CD4⁺ Т-клеток имеет преимущество, заключающееся в том, что число копий GITR остается на эндогенных уровнях, тогда как в рекомбинантной системе используются клетки с более высоким числом копий GITR.

Сначала антитела против GITR тестировали на предмет пролиферативной способности CD4⁺ Т-клеток в присутствии связанного с планшетом антитела против CD3. Вкратце, человеческие CD4⁺ Т-клетки выделяли из лейкоцитарных мас здоровых доноров с использованием Human CD4⁺ T cell Enrichment Cocktail (Stemcell Technologies). Затем наивные Т-клетки обогащали путем истощения CD45RO⁺ клеток с помощью MACS (Miltenyi Biotech). Приблизительно 5×10^4 Т-клеток высевали в 96-луночные полистирольные планшеты с U-образным дном, предварительно покрытые субоптимальным количеством mAb против CD3 OKT3 (30 нг/мл) и тированными количествами антител против GITR или контролей. Через трое суток после стимуляции добавляли меченный тритием тимидин (1 мкКи на лунку, Perkin Elmer Health Sciences NET027001) в каждую микролунку и генерировали импульсы в течение 18 ч. Клетки собирали на фильтровальных планшетах (Unifilter-96 GF/C 6005174) с использованием устройства Filtermate Harvester (Perkin Elmer Health Sciences D961962). Добавляли сцинтилляционную жидкость (Perkin Elmer Health Sciences Microscint20 6013621) в фильтровальные планшеты и измеряли радиоактивные импульсы с использованием устройства для считывания планшетов (Perkin Elmer Health Sciences Topcount NXT). Т-клеточная пролиферация относительно контроля, представленная как средняя кратность активации при концентрации антитела 10,6 нМ, показана в табл. 7. В данном формате анализа концентрация 10,6 нМ представляла точку, при которой Т-клеточная пролиферация достигала плато на кривой "доза-ответ".

Таблица 7. Т-клеточная пролиферативная активность (кратность активации) связанных с планшетом антител против GITR при 10,6 нМ в присутствии связанных с планшетом Ab против CD3

Антитело	Донор								Средняя кратность активации
	1	2	3	4	5	6	7	8	
H4H14536P2	3	24	24	25	24	47	26	16	23
H4H14508P	10	4	4	7	4	11	3	2	5
H4H14525P	6	1	1	2	1	3	2	1	2

H4H14469P	3	12	12	15	12	17	11	11	12
H4H14532P2	2	6	6	12	6	19	7	2	8
H4H14470P	0	3	3	4	3	6	4	1	3
H4H14475P	0	2	2	2	2	12	1	0	3
H4H14528P	2	8	8	4	8	31	5	4	8
H4H14539P2	2	12	12	13	12	39	11	6	13
H4H14516P	1	4	4	12	4	14	4	1	5
H4H14521P	1	4	4	5	4	12	3	2	4
Контрольное Ab против GITR 1-mIgG1	6	23	23	40	23	66	25	11	27
Изотипный контроль	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Результаты в табл. 7 показывают, что тестируемые антитела против GITR демонстрировали Т-клеточную пролиферативную способность при связывании с планшетом в присутствии связанных с планшетом антител против CD3. Контрольные Ab против GITR I демонстрировали пролиферативную активность, в 27 раз превышающую таковую изотипного контроля. Большинство антител против GITR в соответствии с настоящим изобретением демонстрировало активацию, в 2-8 раз превышающую таковую изотипного контроля, при этом некоторые типичные антитела H4H14469P, H4H14539P2 и H4H14536P2 демонстрировали активацию, в 12, 13 и 23 раза превышающую таковую контроля соответственно. В заключение, результаты показывают, что тестируемые антитела против GITR демонстрировали Т-клеточную пролиферативную активность в этом классическом формате.

Затем использовали анализы дополнительного формата для тестирования способности антител против GITR активировать Т-клетки в присутствии или в отсутствие связанного с клеточной поверхностью Fc-гамма-R.

Для оценивания способности антитела против GITR активировать Т-клетки в присутствии закоривания Fc-гамма-R1 клетки HEK293 конструировали с экспрессией высокоаффинного рецептора hFc-гамма-R1, как описывается выше. Клетки HEK293/Fc-gamma-R1 обрабатывали 50 мкг/мл митомицина С в течение 30 мин при 37°C для ингибирования пролиферации. После последующих промываний для удаления следов митомицина С клетки покрывали 300 нг/мл антитела против CD3 ОКТ3 для стимуляции активации Т-клеток. Клетки HEK293/Fc-gamma-R1 совместно культивировали с человеческими наивными CD4+ Т-клетками в отношении 1:2 и добавляли титруемые количества антител против GITR или контролей в среду совместного культивирования.

Т-клеточную пролиферацию оценивали путем измерения уровней включения меченного тритием тимидина. Через 72 ч после стимуляции добавляли меченный тритием тимидин (0,5 мкКи на лунку, Perkin Elmer Health Sciences) в каждую микролунку в течение дополнительных 18 ч при 37°C. Клетки собирали на фильтровальных планшетах (Unifilter-96 GF/C 6005174) с использованием устройства Filtermate Harvester (Perkin Elmer Health Sciences D961962). Добавляли сцинтилляционную жидкость (Perkin Elmer Health Sciences Microscint20 6013621) в фильтровальные планшеты и измеряли радиоактивные импульсы с использованием устройства для считывания планшетов (Perkin Elmer Health Sciences Topcount NXT). Т-клеточная пролиферация относительно контроля, представленная как средняя кратность активации при концентрации антитела 33 нМ, показана в табл. 8. В данном формате анализа концентрация 33 нМ представляла точку, при которой Т-клеточная пролиферация достигала плато на кривой "доза-ответ".

Таблица 8. Т-клеточная пролиферативная активность (кратность активации) антител против GITR при 33 нМ в присутствии заякоривания Fc-гамма-R

Антитело	Донор					Средняя кратность активации
	1	2	3	4	5	
H4H14536P2	1,3	6,3	1,5	2,7	15,7	5,5
H4H14508P	1,0	0,7	1,1	1,8	1,3	1,2
H4H14525P	1,2	0,8	1,0	1,5	1,5	1,2
H4H14469P	0,70	1,0	0,9	1,5	1,5	1,1
H4H14532P2	0,80	0,9	1,0	1,7	2,1	1,3
H4H14470P	1,8	1,0	1,4	1,5	2,0	1,5
H4H14475P	1,0	1,3	1,3	1,6	1,5	1,3
H4H14528P	0,9	1,5	1,1	1,9	1,7	1,4
H4H14539P2	0,9	0,7	1,1	1,5	1,5	1,1
H4H14516P	1,2	0,9	1,2	1,3	1,1	1,1
H4H14521P	1,5	1,1	1,1	1,7	0,9	1,2
H4H14476P	0,6	0,20	0,8	0,8	0,1	0,5
Контрольные mAb против GITR						
Контрольное I-mIgG1	2,8	2,8	1,4	1,1	1,7	2,0
Контрольное I-mIgG2a	1,1	0,1	1,0	1,0	1,2	1,3
Контрольное II-hIgG1	0,1	0,6	1,3	0,2	1,2	0,7
Изотипный контрольный hIgG4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Таблица 9. Т-клеточная пролиферативная активность (EC₅₀) антител против GITR при 33 нМ в присутствии заякоривания Fc-гамма-R

Антитело	Донор					Средняя EC ₅₀ (нМ)
	1	2	3	4	5	
H4H14536P2	1,2	0,5	1,3	11,2	1,6	3,2
Контрольное I-mIgG1	37,2	NA	42,9	3,5	52,7	34,1

Результаты в табл. 8 показывают, что несколько антител демонстрировали активацию, превышающую контроли, с уровнями варьирующими от 1 до 2 раз. Однако одно типичное антитело H4H14536P2 демонстрировало эффективную Т-клеточную пролиферативную активность в условиях заякоривания. Со средней кратностью активации 5,5 H4H14536P2 стимулировало более высокую Т-клеточную активацию по сравнению с антителами сравнения против GITR (диапазон средней кратности активации 0,7-2,0). H4H14536P2 характеризовалось средней EC₅₀ Т-клеточной пролиферации 3,2 нМ по сравнению с 34,1 нМ для наиболее эффективного контрольного Ab против GITR - контрольного I-mIgG (табл. 9). Кроме того, в данном формате анализа H4H14475P, эффективный активатор в рекомбинантном биоанализе, описываемом выше, демонстрировало наибольшую пролиферативную активность в условиях данного первичного биоанализа.

Затем антитела тестировали на предмет Т-клеточной пролиферативной активности в отсутствие заякоривания Fc-гамма-R. Человеческие CD4+ Т-клетки выделяли, как описывается выше, и высевали в 96-луночные полистирольные планшеты с U-образным дном, предварительно покрытые 30 нг/мл антитела

против CD3 ОКТ3. Подобно описанному выше, титрованные концентрации антител против GITR или контролей добавляли в культуральную среду. Т-клеточную пролиферацию измеряли путем включения меченного тритием тимидина. Т-клеточная пролиферация, наблюдаемая у четырех доноров при концентрации антитела 22 нМ, представлена как кратность активации по сравнению с изотипным контролем в табл. 10. EC_{50} (нМ) H4N14536P2 показана в табл. 11.

Как наблюдали в заякоренном формате анализа, H4N14536P2 опять демонстрировало эффективную Т-клеточную пролиферативную активность при 22 нМ в незаякоренном формате. H4N14536P2 активировало Т-клетки со средней кратностью активации 11,0 и EC_{50} 8,3 нМ. В данном формате анализа контрольное антитело против GITR I демонстрировало отсутствие Т-клеточной пролиферативной способности.

Таблица 10. Т-клеточная пролиферативная активность (кратность активации) антител против GITR при 22 нМ в отсутствие заякоривания Fc-гамма-R

Антитело	Донор				Средняя кратность активации
	1	2	3	4	
H4N14536P2	6,2	4,2	10,1	23,4	11,0
H4N14508P	0,7	0,9	0,9	1,4	1,0
H4N14525P	0,7	1,0	0,9	1,0	0,9
H4N14469P	0,9	0,8	1,0	0,9	0,9
H4N14532P2	0,7	0,8	1,0	1,1	0,9
H4N14470P	0,7	0,9	1,0	1,7	1,1
H4N14475P	0,7	1,1	0,8	0,8	0,9
H4N14528P	0,6	0,8	0,9	1,0	0,8
H4N14539P2	0,5	0,8	1,1	0,8	0,8
H4N14516P	0,7	1,2	1,0	0,9	0,9
H4N14521P	0,5	1,2	0,8	1,0	0,9
H4N14476P	0,7	0,9	0,9	0,8	0,8
Контрольное Ab против GITR					
Контрольное I- mIgG1	0,7	0,8	1,0	1,0	0,9
Изотипный контроль	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Таблица 11. EC_{50} (нМ) H4N14536P2

Донор	1	2	3	4	Среднее
EC_{50} H4N14536P2 (нМ)	12,2	6,4	9,0	5,7	8,3

В заключение, данный пример демонстрирует, что одно типичное антитело против GITR H4N14536P2 демонстрирует эффективную Т-клеточную пролиферативную активность в присутствии и в отсутствие заякоривания hFc-гамма-R1, тогда как контрольное антитело сравнения против GITR I демонстрировало отсутствие Т-клеточной пролиферативной активности в условиях отсутствия заякоривания. Таким образом, способность H4N14536P2 активировать Т-клетки в отсутствие заякоривания hFc-гамма-R1 является уникальным свойством, предполагающим, что антитело может не конкурировать с эндогенным IgG за связывание с Fc-гамма-рецепторами *in vivo* с сохранением активности. Это уникальное свойство H4N14536P2 может обеспечивать преимущество в терапевтических условиях.

Пример 7. Введение антител против GITR в комбинации с антителами против PD1 синергически контролирует и ликвидирует опухоли.

Выполняли оценивание эффекта введения антител против GITR в комбинации с антителами против PD1 в отношении роста опухоли с использованием следующих способов. Результаты оценивания приводятся ниже.

Имплантация опухоли, режим лечения и измерение роста

Клетки рака толстой и прямой кишки MC38 (полученные из ATCC) имплантировали подкожно мышам C57BL/6 (3×10^5 клеток/мышь) (определяли как день 0). В день 6 (т.е. через 6 суток после имплантации опухоли) мышей разделяли на 4 группы (по 5 мышей на группу) и каждую группу обрабатывали интраперитонеально (IP) следующим образом: (1) крысиный IgG2a (2A3, Bio X cell, № по кат. BE0089) (изотипный контроль) + крысиный IgG2b (LTF2, Bio X cell, № по кат. BE0090) (изотипный контроль) (2) моноклональное антитело против GITR DTA1 (крысиное антитело против мышинового GITR, Bio X cell, № по кат. BE0063) + крысиный IgG2a (контроль) (3) моноклональное антитело против PD-1 RPM1-14 (крысиное антитело против мышинового PD-1, Bio X cell, № по кат. BE0146) + крысиный IgG2b (контроль) или (4) антитело против GITR DTA1 + антитело против PD-1 RPM1-14. Затем снова вводили инъекцию(и) антител в день 13. Обработки антителами вводили дозой 5 мг/кг каждого антитела. Опухоли измеряли в двух направлениях (длина×ширина) и вычисляли объем опухоли (длина×ширина²×0,5). Мышей умерщвляли при достижении опухолью определенной конечной точки опухоли (объем опухоли > 2000 мм³ или изъязвление опухоли).

Оценивание повторной опухолевой провокации

Мышей, обрабатываемых комбинацией антитела против PD-1 и антитела против GITR, которые оставались без опухоли в течение 80 суток, повторно провоцировали 3×10^5 клетками сингенной опухоли (MC38) в правый бок и $2,5 \times 10^5$ клетками линии аллогенной опухоли (B16F10.9) (линии меланомных клеток, ATCC) в левый бок. За опухолями наблюдали, как описывается выше.

Эксперименты с истощением антителами

Мышам вводили инъекцией разные истощающие mAb (антитело против CD4, антитело против CD8, антитело против CD25), начиная за одни сутки до провокации опухолью, и давали дважды в неделю всего восемь дозами, обрабатывали комбинированной терапией или изотипным контрольным IgG. Эффективность истощения подтверждали анализом FACS образцов периферической крови.

Анализ проточной цитометрии (FACS) внутриопухолевых лимфоцитов

Мышей обрабатывали, как описывается выше. Через 5 суток после обработки антителом собирали опухоль и селезенку. Опухоли измельчали ножницами и диссоциировали до одноклеточной суспензии с помощью смеси Liberase TL/DNAse I. Селезенки диссоциировали с помощью gentleMACS Octo Dissociator. Клетки окрашивали панелями антител FACS против мышинового CD45, CD3, CD4, CD8, CD25 и FoxP3, а также маркерами активации (PD1, GITR, Ki67, CD160, CTLA4, ICOS, TIM3, LAG3, KLRG1 и CD44). Клетки приобретали в BD Fortessa X20 или LSR II и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo.

Введение антител против мышинового GITR в комбинации с антителами против мышинового PD1 существенно индуцирует регрессию опухоли и обеспечивает длительную ремиссию опухоли у несущих MC38 мышей.

С использованием способов, описываемых выше, оценивали эффективность введения антитела против мышинового GITR (клона DTA-1, Bio X cell, № по кат. BE0063) в комбинации с антителом против мышинового PD-1 (клон RMP1-14, Bio X cell, № по кат. BE0146) в контроле подкожных опухолей MC38. Как показано на фиг. 1 и в табл. 12 и 13, комбинированная обработка блокады PD1 и антитела против GITR (DTA-1) существенно индуцировала регрессию опухоли у несущих опухоль MC38 мышей, в отличие от обработанных mAb против PD-1 или против GITR отдельно или изотипным контролем мышей. Кроме того, мыши, обрабатываемые комбинированной терапией, демонстрировали длительную ремиссию опухоли, поскольку 100% мышей оставались без опухолей на протяжении 120 суток (фиг. 2, табл. 14, 15).

Таблица 12. Средние объемы опухоли для каждой обрабатываемой группы ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) и мыши без опухоли после обработки Ab против GITR и/или против PD-1

Обрабатываемая группа	Объем опухоли (мм^3)					Мыши без опухоли
	Среднее (SEM)					
	День 10	День 13	День 17	День 19	День 21	День 21
Изотип (крысиный IgG2a + крысиный IgG2b)	196 (44)	232 (46)	802 (869)	NA	NA	0/5
Антитело против PD1 + крысиный IgG2b	181 (37)	259 (103)	551 (199)	880 (335)	1550 (616)	0/5
Антитело против GITR + крысиный IgG2a	172 (9)	262 (72)	407 (112)	741(269)	882 (307)	0/5
Антитело против GITR + антитело против PD1	130 (29)	41 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5/5

Таблица 13. Краткое описание мышей без опухоли из трех независимых экспериментов после обработки Ab против GITR и/или против PD1

Обрабатываемая группа	Мыши без опухоли
Изотип (крысиный IgG2a + крысиный IgG2b)	0/15
Антитело против PD1 + крысиный IgG2b	0/15
Антитело против GITR + крысиный IgG2a	1/15
Антитело против GITR + антитело против PD1	10/15

Таблица 14. Доли выживших (процент)

Дни	Изотип	Антитело против PD-1	Антитело против GITR	Антитело против PD-1 + антитело против GITR
0	100	100	100	100
17	80			
21		40		
24	0		60	
26			20	
35		20		
52		0	0	
123				100

Введение антител против мышиного GITR в комбинации с антителами против мышиного PD1 индуцирует опухоле-/антиген-специфический ответ иммунологической памяти.

Для определения развития у мышей, обрабатываемых комбинированным введением антител против PD-1 и антител против GITR, опухоле-/антиген-специфического анамнестического ответа выживших безопухолевых мышей повторно провоцировали 3×10^5 клетками сингенной карциномы толстой

кишки MC38 в правый бок и $2,5 \times 10^5$ клеточной линией аллогенной меланомы B16F10.9 в левый бок. Обнаружили, что опухоли MC38 не росли у мышей, обработанных комбинацией антитела против PD1 и антитела против GITR, тогда как те же опухоли росли у необработанных контрольных мышей (без какого-либо предварительного лечения) (фиг. 3). Напротив, аллогенная опухоль (меланома) не росла в обеих группах, демонстрируя, что комбинированное введение антител против PD-1 и против GITR индуцирует опухоль-/антиген-специфический ответ иммунологической памяти, способный контролировать вторую провокацию тем же типом опухоли.

Иммунное популяционное исследование

Мышей обрабатывали истощающими mAb против CD4, CD8 и CD25 перед комбинированной обработкой антителом против PD-1 и антителом против GITR. Обнаружили, что истощение CD8+ клеток полностью отменяло противоопухолевый эффект (опухоли MC38), тогда как истощение CD4 или CD25 Т-клеток демонстрировало частичное ингибирование (фиг. 4, табл. 15). Таким образом, противоопухолевый эффект комбинированной терапии на опухолях MC38 проявляется преимущественно в зависимости от CD8 + Т-клеток.

Оценивали эффект комбинированной обработки антитела против GITR и антитела против PD1 на инфильтрующиеся из опухоли лимфоциты (TIL). Выяснили, что комбинированная обработка индуцировала существенное повышение отношения CD8/Treg по сравнению с монотерапевтической обработкой (антителом против PD-1 или антителом против GITR) или изотипным контролем (фиг. 5). Выяснили, что эффект комбинированной обработки на отношение CD4/Treg был менее выраженным. Комбинированная обработка антителом против PD-1 и антителом против GITR снижала процент внутриопухолевых Treg, тогда как она повышала CD8 Т-клетки (фиг. 6). Кроме того, обработка антителом против PD-1 отдельно индуцировала увеличение числа Treg клеток, тогда как комбинированная обработка антителом против PD-1/антителом против GITR существенно снижала его по сравнению с обработанными изотипным контролем мышами.

Таблица 15. Противоопухолевая эффективность после истощения CD4, CD8 или CD25

Иммунотерапия	Истощающее антитело	Размер опухоли (мм ³) Среднее (SEM)		
		День 8	День 12	День 16
Изотипный контроль	Изотипный контроль	55 (12)	161 (60)	555 (224)
	Антитело против CD4	48 (17)	60 (22)	135 (71)
	Антитело против CD8	49 (17)	176 (431)	825 (431)
	Антитело против CD25	59 (16)	61 (21)	182 (68)
Антитело против GITR + антитело против PD1	Изотипный контроль	43 (19)	26 (16)	11 (7)
	Антитело против CD4	68 (21)	50 (32)	123 (122)
	Антитело против CD8	67 (23)	222 (86)	1041 (543)
	Антитело против CD25	14 (6)	35 (30)	80 (64)

Введение антител против человеческого GITR в комбинации с антителами против мышинного PD1 существенно индуцирует регрессию опухоли и обеспечивает длительную ремиссию опухоли у несущих MC38 GITR/ITRL гуманизированных мышей.

Эффективность введения антитела против человеческого GITR (H2aM14536P2) в комбинации с антителом против мышинного PD-1 (клон RMP1-14 Bio X cell, № по кат. BE0146) на контроль подкожных

опухолей MC38 оценивали на GITR/GITRL гуманизированных мышах. Выяснили, что блокада антитела против мышиноного PD-1 синергизировала с антителом против человеческого GITR и существенно индуцировала регрессию опухоли (4/6 мышей) у несущих опухоль MC38 мышей по сравнению с мышами, обрабатываемыми mAb против PD1 (1/7) или против GITR (1/7) отдельно или изотипным контролем (0/7), как показано на средних кривых роста опухоли (фиг. 7, табл. 16). Кроме того, мыши, обрабатываемые комбинированной терапией, демонстрировали длительную ремиссию опухоли, поскольку более 60% мышей оставались без опухолей на день 50, по сравнению с 0% для групп, обрабатываемых изотипным контролем, и 10% для групп, обрабатываемых антителом против PD-1 или антителом против GITR (фиг. 8, табл. 16).

**Антитела против человеческого GITR повышали
внутриопухолевое отношение CD8/Treg**

Оценивали эффект антител против человеческого GITR на популяции Т-клеток внутри опухоли и в селезенке. Оценивали антитела против человеческого GITR H2aM14536P2 и H1H14536P2. Выяснили, что оба изотипа антитела против человеческого GITR (mIg2a и hIgG1) индуцировали существенное повышение внутриопухолевого отношения CD8/Treg (фиг. 9). Та же обработка не оказывала эффекта на подгруппы периферических селезеночных Т-клеток. Человеческий IgG1 и изотип IgG мышиноного IgG2a использовали в анализе для контролей.

Таблица 16. Противоопухолевая эффективность, опосредованная обработкой антителом против человеческого GITR и антителом против мышиноного PD1

Обрабатываемая группа	Размер опухоли (мм ³) Среднее (SEM)				Мыши без опухоли
	День 9	День 13	День 16	День 19	
Изотипный контроль	146 (26)	248 (53)	402 (97)	838 (205)	0/7 (0%)
Антитело против mPD1	120 (23)	163 (50)	275 (103)	617 (257)	1/7 (14%)
H2aM14536P2	134 (28)	162 (51)	194 (51)	346 (87)	1/7 (14%)
H2aH14536P2 + антитело против PD-1	122 (18)	90 (54)	114 (88)	192 (165)	4/6 (67%)

Введение антител против мышиноного GITR в комбинации с антителами против человеческого PD1 существенно индуцирует регрессию опухоли и обеспечивает длительную ремиссию опухоли у несущих MC38 PD1/PDL1 гуманизированных мышей

Эффективность введения антитела против мышиноного GITR (DTA-1) в комбинации с антителом против человеческого PD-1 (REGN2810, также известного как H4H7798N, как раскрывается в патентной публикации США № 2015/0203579) на контроль подкожных опухолей MC38 оценивали на PD1/PDL1 гуманизированных мышах. Выяснили, что блокада антитела против человеческого PD-1 синергизировала с антителом против мышиноного GITR и индуцировала задержку роста опухоли у несущих опухоль MC38 мышей по сравнению с мышами, обрабатываемыми mAb против PD1 или против GITR отдельно или изотипным контролем, как показано на средних кривых роста опухоли (фиг. 10, табл. 17). Кроме того, мыши, обрабатываемые комбинированной терапией, демонстрировали длительную ремиссию опухоли, поскольку более 40% мышей оставались без опухолей на день 45, по сравнению с 0% для групп, обрабатываемых изотипным контролем, антителом против PD-1 или антителом против GITR (фиг. 11).

Таблица 17. Противоопухолевая эффективность, опосредованная обработкой антителом против мышинного GITR + Ab против человеческого PD1

Обрабатываемая группа	Размер опухоли (мм ³)			
	Среднее (SEM)			
	День 13	День 17	День 20	День 24
Изотипный контроль	301 (38)	742 (81)	1392 (104)	2790 (366)
Антитело против PD1 (REGN2810)	184 (21)	354 (143)	589 (201)	937 (324)
Антитело против GITR	362 (99)	713 (360)	1199 (563)	NA
Антитело против GITR + антитело против PD-1	212 (117)	120 (60)	127 (62)	167 (98)

Пример 8. Экстракция и анализ РНК.

Анализ RNA-seq полученных сортировкой одиночных клеток В день 8 и 11 после провокации опухолью готовили суспензия отдельных клеток опухоли с помощью набора для диссоциации опухоли мыши (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE) и разделяли селезенки с помощью устройства gentleMACS™ Octo Dissociator (Miltenyi Biotec). Опухоли и селезенки из одной и той же обрабатываемой группы объединяли и жизнеспособные CD8⁺ Т-клетки сортировали с помощью FACS. Сортированные с помощью FACS Т-клетки смешивали с C1 Cell Suspension Reagent (Fluidigm, South San Francisco, CA) перед загрузкой на 5-10-мкм C1 Integrated Fluidic Circuit (IFC; Fluidigm). Окрашивающий раствор LIVE/DEAD готовили путем добавления 2,5 мкл этидия гомодимера-1 и 0,625 мкл кальцеина AM (Life Technologies, Carlsbad, CA) в 1,25 мкл C1 Cell Wash Buffer (Fluidigm) и 20 мкл загружали на C1 IFC. Каждый сайт захвата тщательно осматривали под микроскопом Zeiss в световом поле, GFP и каналах Texas Red на предмет клеточных дублетов и жизнеспособности. Выполняли лизис клеток, обратную транскрипцию и амплификацию cDNA на C1 Single-Cell Auto Prep IFC, как указано изготовителем (протокол 100-7168 E1). Использовали набор Ultra Low RNA Kit SMARTer™ (Clontech, Mountain View, CA) для синтеза cDNA из отдельных клеток. Конструировали библиотеки Illumina NGS с использованием набора NEXTERA XT DNA Sample Prep kit (Illumina), согласно рекомендациям изготовителя (протокол 100-7168 E1). Всего секвенировали 2222 отдельных клеток на Illumina NextSeq (Illumina, San Diego, CA) путем мультиплексированного прогона с однократным считыванием при 75 циклах. Необработанные данные секвенирования (файлы BCL) конвертировали в формат FASTQ с помощью Illumina CASAVA 1.8.2. Считывания декодировали на основании их штрих-кодов. Качество считываний оценивали с использованием FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

Пример 9. Роль CD226 и TIGIT в комбинированной обработке.

Генетическая инактивация или фармакологическое ингибирование CD226 отменяли регрессию опухоли, опосредованную комбинированной обработкой антителом против GITR/антителом против PD1 комбинированное лечение в некоторых экспериментах, тогда как ингибирование других представителей суперсемейства TNF-рецепторов или B7 не оказывало эффекта.

Эксперимент с блокированием CD226

0,5 мг антитела против CD226 (10E5, eBioscience, San Diego, CA) или изотипного контроля IgG крысиного IgG2b (LTF2, Bio X Cell, West Lebanon, NH) вводили интраперитонеальной (i.p.) инъекцией в день 5 после провокации опухолью и за одни сутки до иммунотерапии. Перпендикулярные диаметры опухоли измеряли слепым методом 2-3 раза в неделю с использованием цифровых штангенциркулей (VWR, Radnor, PA). Объем вычисляли с использованием формулы $L \times W \times 0,5$, в которой L представляет собой самое большое измерение, а W представляет собой перпендикулярное измерение. Различия в выживаемости определяли для каждой группы по методу Каплан-Мейера и общее значение P вычисляли с помощью логарифмического рангового критерия с использованием анализа выживаемости по PRISM версии 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Событие определяли как смерть, если опухолевая нагрузка достигала установленного по протоколу размера 2000 мм³ в максимальном объеме опухоли для минимизации заболеваемости.

Как показано на фиг. 12 и 13, несущих опухоль MC38 мышей обрабатывали либо блокирующим Ab против CD226, либо изотипным Ab (контрольным IgG) за 1 сутки до иммунотерапии антителом против GITR + антителом против PD-1 или изотипным Ab. Показаны кривая среднего роста опухоли (фиг. 12) и кривые выживаемости (фиг. 13). Данные представляют три эксперимента, n=5 мышей на группу, анализ выживаемости по логарифмическому ранговому критерию.

Мышей дикого типа или TIGIT KO провоцировали опухолями MC38, обрабатывали антителом против CD226 или контрольным IgG и давали либо изотипный контроль (фиг. 14), либо комбинированную

терапию антител против GITR + антител против PD-1 (фиг. 15). Приведенные данные представляют собой кривые среднего роста опухоли, представляющие два эксперимента (n=4-5 мышей на группу).

С использованием блокирующего mAb против CD226 показали, что совместная стимуляторная передача сигнала посредством CD226 необходима для противоопухолевого иммунитета, опосредованного комбинированным лечением. Кроме того, путь передачи сигнала через CD226 был необходим для усиления надзора за опухолями у мышей TIGIT KO (фиг. 14 и 15).

Сигнатуры РНК в CD8⁺ Т-клетках из образцов после комбинированной обработки

Для идентификации уникальных генных сигнатур в клонально размножаемых CD8⁺ Т-клетках (опухоли, собранные в день 11) из образцов после комбинированной обработки выполняли полное сравнение по всем разным обрабатываемым группам. Активируемые гены в клонально размножаемых CD8⁺ Т-клетках после комбинированной терапии сравнивали с активируемыми генами CD8⁺ Т-клеток после обработки изотипом или неразмножаемых CD8⁺ Т-клеток с комбинированной обработкой. Анализ теплового картирования выявил тридцать генов, перекрывающихся при сравнении. Изменение сигнатуры РНК \geq в 2 раза ($p < 0,01$) наблюдали в популяции нарастаемых CD8 Т-клеток для 30 генов после комбинированного лечения антителом против GITR/антителом против PD1 опухолей. Эти 30 генов включают в себя Id2, S100a11, Ndufb3, Serinc3, Ctsd, S100a4, Ppp1ca, Lbr, Pel1l, Lcp2, Ube2h, Cd226, Mapkapk3, Racgap1, Arf3, Mki67, Ergic2, Azi2, Dyncli2, Sik1, Pde4d, Ppp3cc, Nek7, Emc4, Vav1, Dock10, Tmem173, Fam3c, Ppp1cc и Glud1.

Затем выполняли четырехпараметрическое сравнение по всем пяти группам (т.е. (i) обработка изотипом, (ii) антителом против GITR размножаемых CD8, (iii) комбинацией антитела против GITR/антитела против PD1 размножаемых CD8, (iv) антителом против PD1 размножаемых CD8 и (v) комбинацией антитела против GITR/антитела против PD1 неразмножаемых CD8) для выявления генов, специфически регулируемых при комбинированной терапии относительно монотерапевтической обработки. Идентифицировали два перекрывающихся активируемых гена ($p < 0,01$, ≥ 2 -кратное изменение в экспрессии) в четырехпараметрическом анализе. CD226, который представляет собой костимуляторную молекулу, играющую важную роль в противоопухолевом ответе, идентифицировали как один из двух генов, распределяемых по всем разным парам сравнения. Анализ экспрессии разных подгрупп внутриопухолевых CD8⁺ Т-клеток ((a) всех, (b) клонально размножаемых или (c) неразмножаемых) по всем обрабатываемым группам (т.е. (i) изотипом, (ii) антителом против GITR, (iii) антителом против PD1 и (iv) комбинацией антител против GITR/антител против PD1) выявил, что уровни mRNA CD226 были существенно повышены комбинированной обработкой у клонально размножаемых Т-клеток (изменение кратности =10,7), тогда как это различие ослабевало в массе (изменение кратности =3,5) и в неразмножаемых CD8⁺ Т-клетках (незначительное). Кроме того, уровни mRNA CD226 были существенно повышены за счет комбинированной обработки в клонально размножаемых CD8 Т-клетках по сравнению с обрабатываемыми антителом против PD-1 (изменение кратности =6,5) и антителом против GITR (изменение кратности =9,2) (фиг. 16).

Ассоциация между PD1 и CD226

Далее исследовали потенциальную ассоциацию между молекулами PD1 и CD226. Для проверки того, является ли CD226 целью для дефосфорилирования комплексом PD1-Shp2, восстанавливали различные компоненты, вовлеченные в Т-клеточную передачу сигнала, в бесклеточной системе больших однослойных везикул (LUV) (т.е. CD3, CD226, цитозольную тирозинкиназу Lck, Zap70, SLP76 52 и PI3K (p85a)). Чувствительность каждого компонента в ответ на титрование PD-1 в LUV измеряли с помощью фосфотирозинового (pY) иммуноблоттинга (фиг. 17). Подтверждали, что TCR/CD3 ζ не был целью дефосфорилирования комплексом PD-1-Shp2, тогда как CD226 эффективно дефосфорилировался комплексом PD1-Shp2 зависимым от дозы образом через 30 мин после обработки (фиг. 17). Эти данные демонстрировали ассоциацию между PD-1 и CD226.

Затем исследовали взаимосвязь между ингибированием PD-1 и экспрессией CD226 в клинических условиях. Выполняли анализ секвенирования РНК на опухолевых биоптатах, собранных от 43 больных раком поздней стадии до и после нацеленного на PD-1 лечения. Экспрессия CD226 была существенно повышена после двух доз лечения антителом против hPD-1 у раковых больных (фиг. 22). Далее исследовали клинические данные из The Cancer Genome Atlas (TCGA), чтобы проверить, соответствует ли уровень экспрессии CD226 общей силе активации Т-клеток и может ли служить предсказанием лучшего прогноза у больных раком. Действительно, больные с высокой исходной экспрессией CD226 имели вероятности существенно более высокой выживаемости при пяти (меланома кожи, аденокарцинома легкого, плоскоклеточная карцинома области головы и шеи, карцинома эндометрия тела матки и саркома) из двадцати разных оцениваемых типов рака (меланома кожи, аденокарцинома легкого, плоскоклеточная карцинома области головы и шеи, карцинома эндометрия тела матки, саркома, аденокарцинома прямой кишки, инвазивная карцинома молочной железы, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома шейки и эндоцервикальная аденокарцинома, мультиформная глиобластома, аденокарцинома толстой кишки, аденокарцинома желудка, уротелиальная карцинома мочевого пузыря, карцинома щитовидной железы, аденокарцинома предстательной железы, аденокарцинома поджелудочной

железы, низкодифференцированная глиома головного мозга, плоскоклеточная карцинома легкого, папиллярный тип почечно-клеточной карциномы почки и тяжелая цистаденокарцинома яичника). В целом данные результаты поддерживают иммунотерапевтическую стратегию, которая усиливает передачу сигнала CD226, одновременно блокируя при этом TIGIT (например, посредством обработки антителом против GITR) для максимальной T-клеточной активации.

Генетическая инактивация CD226

С использованием блокирующего CD226 mAb показали, что костимуляторная передача сигнала посредством CD226 была необходима для противоопухолевого иммунитета, опосредованного комбинированным лечением (фиг. 12, 13). Поскольку Ab против CD226 возможно могло оказывать потенциальный истощающий эффект в отношении подгруппы CD8 T-клеток, CD226 генетически инактивировали у исходных мышей C57BL/6 для подтверждения этого результата. CD226^{-/-} мыши демонстрировали отсутствие дефекта в гомеостазе T-клеток (CD4⁺, CD8⁺, Treg) (фиг. 18, панели A-D) и отвечали подобно мышам дикого типа на TCR активацию (фиг. 18, панели E-I). наблюдали, что комбинированное лечение больше не обеспечивало противоопухолевый эффект или выживаемость у CD226^{-/-} мышей, что указывало на то, что CD226 необходим для наблюдаемых противоопухолевых эффектов комбинации (фиг. 19, панель A). Эффект CD226 является специфическим, поскольку ингибирование других представителей суперсемейства рецепторов TNF (OX40L или 4-1BBL) или блокада костимуляторной молекулы B7 (CD28) с использованием CTLA4-Ig сохраняли противоопухолевый эффект, опосредованный комбинированной терапией (фиг. 19, панели B-D).

Требование к CD226 у животных с нулевым TIGIT

Данные полного секвенирования РНК полученных сортировкой одиночных клеток и фенотипирования с помощью FACS показывали, что антитело против PD-1 благоприятствует экспрессии CD226, тогда как обработки антителом против GITR подавляет экспрессию TIGIT на поверхности, синергически нарушая гомеостатическую T-клеточную функцию.

Продемонстрировали, что путь передачи сигнала CD226 необходим для усиления надзора за опухолями у TIGIT^{-/-} мышей (фиг. 14, 15). Кроме того, мыши, несущие клетки опухоли MC38, надэкспрессирующие CD155/PVR6, который является основным лигандом для CD226, демонстрировали существенную задержку роста опухоли при терапии антителом против PD-1 или антителом против GITR или комбинированной терапии по сравнению с опухолевыми клетками с MC38-пустым вектором (MC38-EV) или с мышами, обработанными изотипным контролем (фиг. 20). Анализ иммунного профилирования мышей с трансплантированными MC38-CD155 подтвердил устойчивый более высокий уровень экспрессии CD155 на клетках MC38-CD155 по сравнению с MC38-EV (пустой вектор) после имплантации. Выяснили, что надэкспрессия CD155 на опухолевых клетках MC38 ассоциировалась с уменьшенной выявляемой экспрессией CD226 на CD4⁺, CD8⁺ T-клетках и Treg (фиг. 21A), в то время как она усиливала активацию T-клеток, как показано усиленной экспрессией IFN γ (фиг. 21B) и 4-1BB (фиг. 21C) на внутриопухолевых T-клетках. На периферии не наблюдали никакого эффекта.

Без углубления в какую-либо теорию предположили, что уровень экспрессии CD226 должен коррелировать с общей активацией T-клеток и может давать лучший прогноз у больных раком. Действительно, больные с высоким уровнем экспрессии CD226 имеют значительно более высокую вероятность выживания при трех типах рака (меланома кожи, аденокарцинома легкого и саркома). Эти данные поддерживают иммунотерапевтическую стратегию, которая усиливает передачу сигнала посредством CD226, одновременно блокируя при этом TIGIT для максимальной активации T-клеток.

Приведенные выше эксперименты демонстрируют синергический эффект введения антитела против GITR в комбинации с антителом против PD1. В частности, среди прочего приведенные выше эксперименты показывают, что комбинированное введение антитела против GITR и антитела против PD1 индуцирует регрессию опухоли, обеспечивает длительную ремиссию опухолей и индуцирует опухоль-/антиген-специфический ответ иммунологической памяти.

Пример 10. Анализ TCR.

Для анализа TCR разрабатывали новый биоинформационный конвейер gpcTCR для восстановления и экстракции последовательностей TCR, в частности последовательностей TCR-CDR3, из считываний секвенирования короткой РНК при случайном праймировании. gpcTCR берет "paired-" и "single-end" короткие считывания и картирует эти считывания для мышинных или человеческих геномов и транскриптомов, но не для локусов гена TCR и транскриптов, с использованием TopHat (Bioinformatics 25, 1105-1111 (2009)), с параметрами по умолчанию. Картируемые считывания отбрасывали, а некартируемые считывания повторно использовали для извлечения последовательностей TCR. Низкокачественные нуклеотиды в некартируемых считываниях обрезали. Затем считывание с длиной менее 35 пар оснований отфильтровывали с использованием инструментария HTQC (Bioinformatics 14, 33 (2013)). Прошедшие QC короткие считывания собирали в более длинные считывания с использованием параметров по умолчанию iSSAKE (Bioinformatics 25, 458-464 (2009)). Использовали TCRklass (J Immunol 194, 446-454 (2015)) для идентификации последовательностей CDR3 при Scf (оценке свидетельств консервативности остатков) устанавливали вместо значения по умолчанию 1,7 значение 2. Целевые данные TCR-seq из здоровых образцов РВМС человека использовали в качестве положительного контроля для оценивания того, при-

вели ли дополнительные стадии, введенные в конвейер, к более высоким ложным положительным или ложным отрицательным показателям по сравнению с TCRklass отдельно.

Большинство уникальных последовательностей CDR3 из TCRB (64031) или TCRA (51448) выявляли как с помощью grpsTCR, так и с помощью TCRklass. Квадраты корреляций между grpsTCR и TCRklass составляли 0,9999 и 0,9365 для TCRB-CDR3 и TCRA-CDR3 соответственно. В качестве отрицательных контролей использовали шесть линий TCR-негативных раковых или нераковых клеточных линий. Никакие последовательности CDR3 не были выявлены с помощью grpsTCR, тогда как некоторые последовательности CDR были извлечены с помощью TCRklass из некоторых линий TCR-отрицательных раковых клеток.

Для дальнейшего подтверждения эффективности испытуемого конвейера секвенировали образец РВМС здоровых мышей с использованием подходов и целевого TCR-seq, и RNA-seq со случайным праймированием (200 М, 2×100 пар оснований). Хотя количество последовательностей CDR3, собранных из данных RNA-seq, было намного меньше, чем при подходе целевого TCR-seq, приблизительно 45% последовательностей CDR3, идентифицированных из данных RNA-seq с использованием grpsTCR, также наблюдали среди последовательностей CDR3 из целевого TCR-seq. Из-за ограничения методики целевого TCR-seq неудивительно, что часть последовательностей CDR3, которые извлекали из данных RNA-seq, не присутствовала в результатах TCR-seq. Например, эффективность 5'RACE-адаптера, используемого для целевого TCR-seq, как правило, низкая, а Multiply PCR имеет тенденцию амплифицировать TCR высокой частоты, таким образом, целью может быть только небольшая часть TCR. Как и ожидали, гораздо более высокий процент (~70%) последовательностей CDR3, идентифицированных по данным RNA-seq с использованием grpsTCR, также наблюдали среди последовательностей CDR3 высокой частоты ($\geq 0,1\%$) из целевого TCR-seq, тогда как только приблизительно 40% извлекали с использованием TCRklass отдельно. Более того, резали считывания длиной 100 пар оснований на сегменты по 50 пар оснований и рандомно отбирали 200 М считываний. Среди 10 лучших последовательностей CDR3, ранжированных с помощью подхода целевого TCR-seq, 8 последовательностей CDR3 выявляли с помощью grpsTCR авторов настоящего изобретения и только 3 выявляли с помощью TCRklass. Затем применяли конвейер grpsTCR авторов настоящего изобретения для извлечения последовательностей CDR3 из данных RNA-seq одиночных клеток, полученных из внутриопухолевых CD8 Т-клеток MC38, обработанных разными антителами. Частоты выявления последовательностей CDR3_beta и CDR3_alpha с помощью подхода авторов настоящего изобретения сравнивали с опубликованными данными с использованием целевого подхода TCR-seq для выявления последовательностей TCR из секвенирования одиночных клеток для Т-клеток.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описываемыми в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к описываемым в настоящем документе, будут понятными специалистам в данной области из изложенного выше описания и сопровождающих графических материалов. Такие модификации охватываются объемом прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связывают индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR), содержащие три определяющие комплементарность области (CDRs) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) тяжелой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и три CDRs (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) легкой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 402.

2. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит HCVR, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 338, и LCVR, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 402.

3. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит HCVR, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 338, и LCVR, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 402.

4. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или антиген-связывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 340; аминокислотную последовательность HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 342; аминокислотную последовательность HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 344; аминокислотную последователь-

ность LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 404; аминокислотную последовательность LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 406; и аминокислотную последовательность LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 408.

5. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR.

6. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR в отсутствие заякоривания Fc-гамма-рецептора.

7. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.4, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент активирует человеческий GITR в присутствии заякоривания Fc-гамма-рецептора с EC₅₀ менее чем приблизительно 1,0 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB.

8. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связывают индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR), содержащие три CDRs (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) тяжелой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и три CDRs (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) легкой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 402, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент демонстрируют пролиферативную активность в отношении Т-клеток в отсутствие заякоривания Fc, как определяется в анализе пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток.

9. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.8, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент демонстрируют пролиферативную активность в отношении Т-клеток в отсутствие заякоривания Fc с EC₅₀ приблизительно 8 нМ или меньше, как определяется в анализе пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток.

10. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.8, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент активируют человеческий GITR в присутствии заякоривания Fc.

11. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связывают индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR), содержащие три CDRs (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) тяжелой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и три CDRs (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) легкой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 402, при этом антитело или антиген-связывающий фрагмент демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в присутствии заякоривания Fc, по меньшей мере в приблизительно 2 раза выше исходной, как определяется в анализе пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток.

12. Антитело или антиген-связывающий фрагмент по п.11, при этом антитело или антиген-связывающий фрагмент демонстрирует пролиферативную активность в отношении Т-клеток в присутствии заякоривания Fc с EC₅₀ менее чем приблизительно 34 нМ, как определяется с помощью анализа пролиферации наивных человеческих CD4⁺ Т-клеток.

13. Антитело или антиген-связывающий фрагмент по п.11, при этом антитело или антиген-связывающий фрагмент блокирует опосредованную hGITR лигандом (hGITRL) стимуляцию рецептора.

14. Антитело или антиген-связывающий фрагмент по п.11, при этом антитело или антиген-связывающий фрагмент блокирует опосредованную hGITRL стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc.

15. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связывают индуцируемый глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR), содержащие три CDRs (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) тяжелой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и три CDRs (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) легкой цепи, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 402, при этом антитело или антиген-связывающий фрагмент блокирует опосредованную hGITRL стимуляцию рецептора в отсутствие заякоривания Fc при проценте блокирования более чем приблизительно 54% с IC₅₀ менее чем приблизительно 4,0 нМ, как определяется с помощью анализа по репортеру NFκB.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

17. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение композиции по п.16, при этом рак выбирают из группы, состоящей из почечноклеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, рака области головы и шеи, рака предстательной железы, злокачественной глиомы, остеосаркомы, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, рака шейки, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиаль-

ной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, меланомы, рака яичка, почки, пищевода, рака матки, эндометриального рака и рака печени.

18. Способ модуляции противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела, которое связывает GITR по любому из пп.1-15, или его антиген-связывающего фрагмента.

19. Способ по пп.17 или 18, дополнительно предусматривающий введение антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которые связываются со вторым активирующим Т-клетки рецептором.

20. Способ по п.19, при котором активирующий Т-клетки рецептор представляет собой CD28, OX40, CD137, CD27 или HVEM.

21. Способ по любому из пп.17-20, дополнительно предусматривающий введение антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которые связываются с ингибирующим Т-клетки рецептором.

22. Способ по п.21, при котором ингибирующий Т-клетки рецептор представляет собой CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA или LAG-3.

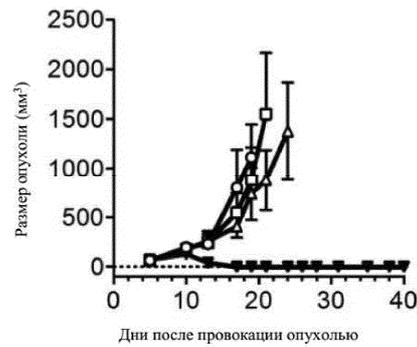
23. Способ по любому из пп.17-22, дополнительно предусматривающий проведение радиационной терапии указанному субъекту.

24. Способ по любому из пп.17-23, дополнительно предусматривающий введение одного или нескольких химиотерапевтических средств.

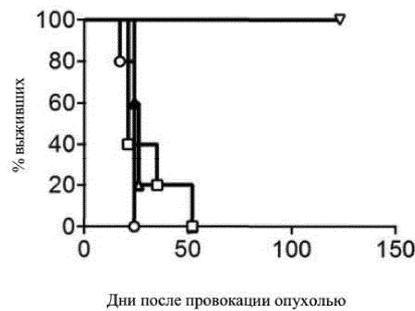
25. Способ по п.22, при котором ингибирующий Т-клетки рецептор представляет собой PD1.

26. Способ по п.25, при котором антитело, которое связывается с Т-клеточным рецептором, представляет собой REGN 2810.

27. Способ по любому из пп.17-26, при котором антитело, которое связывается с GITR, представляет собой антитело по п.1.



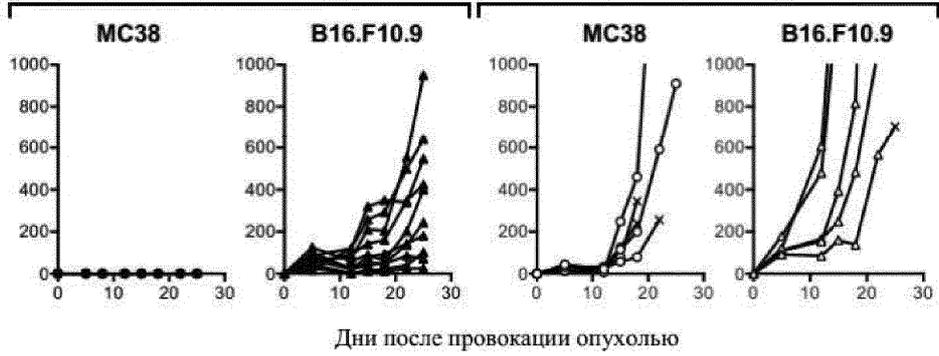
Фиг. 1



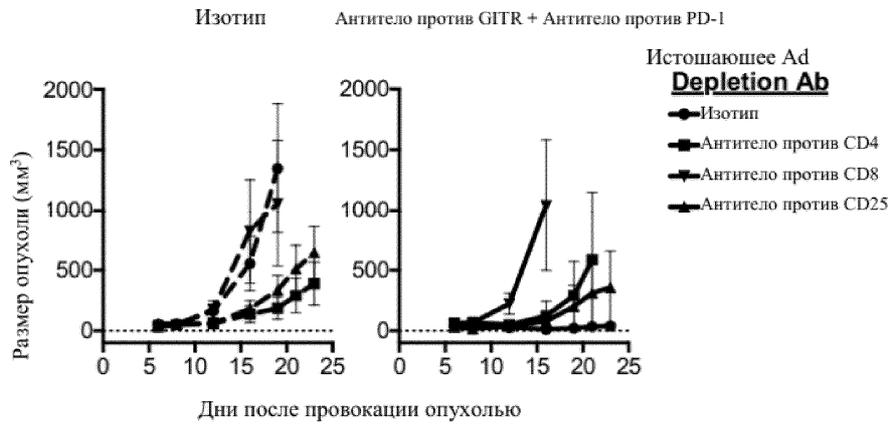
Фиг. 2

Мыши, отторгающие провокацию
опухолью MC38

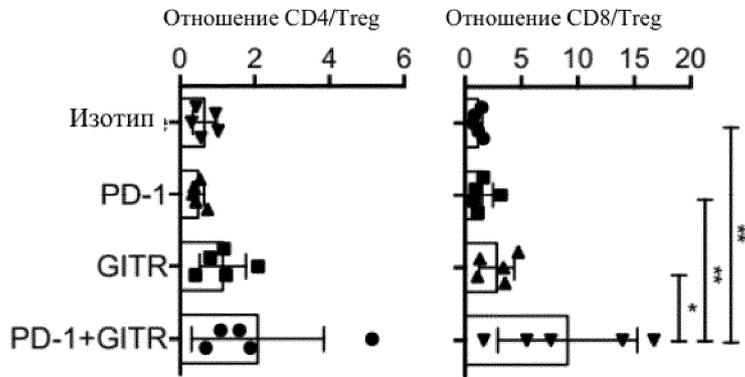
Не получавшие обработку мыши



Фиг. 3

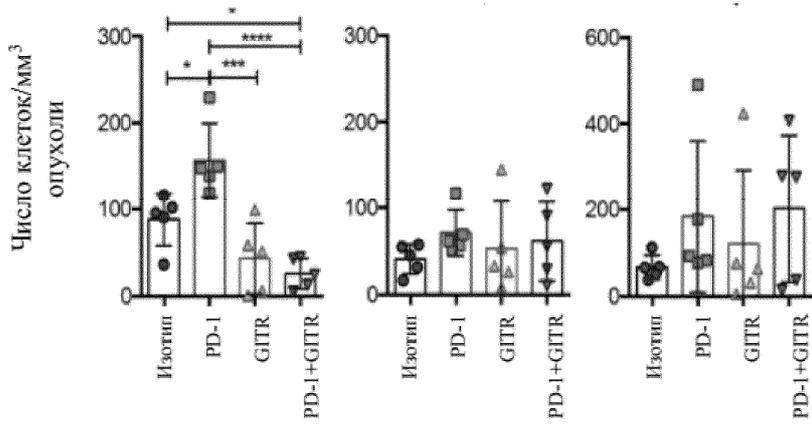
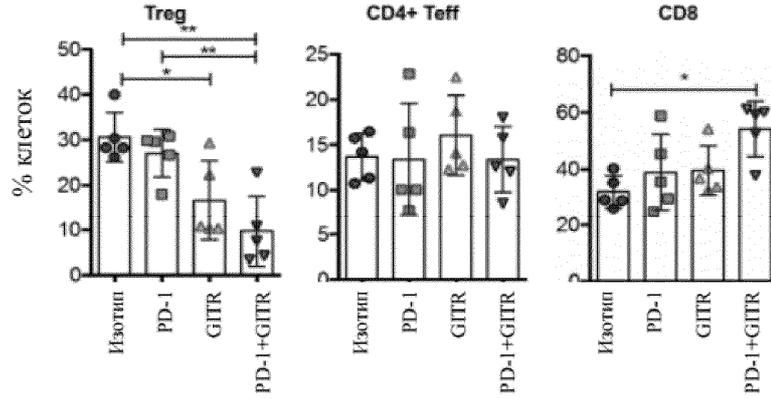


Фиг. 4

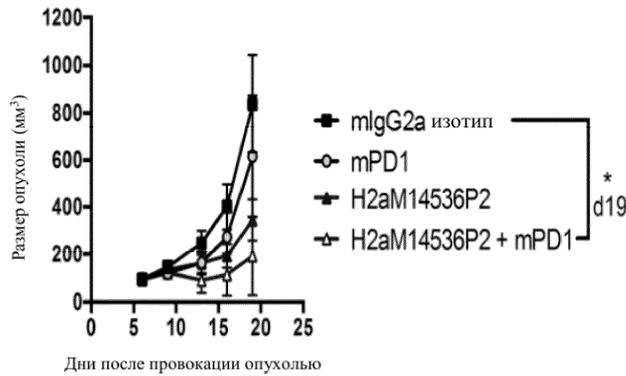


Фиг. 5

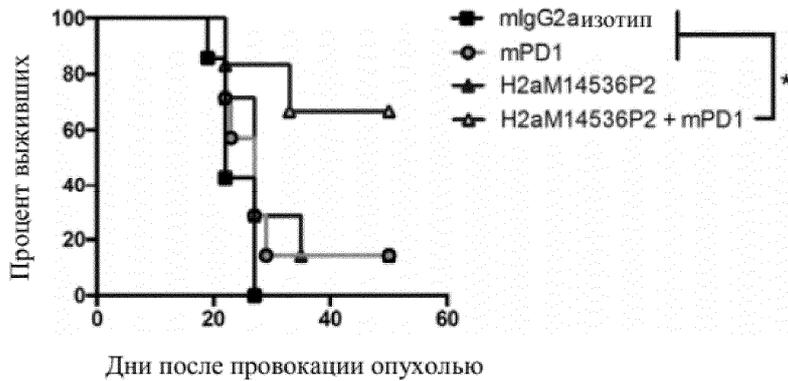
% подгруппы Т-клеток в CD4+Т-клетках



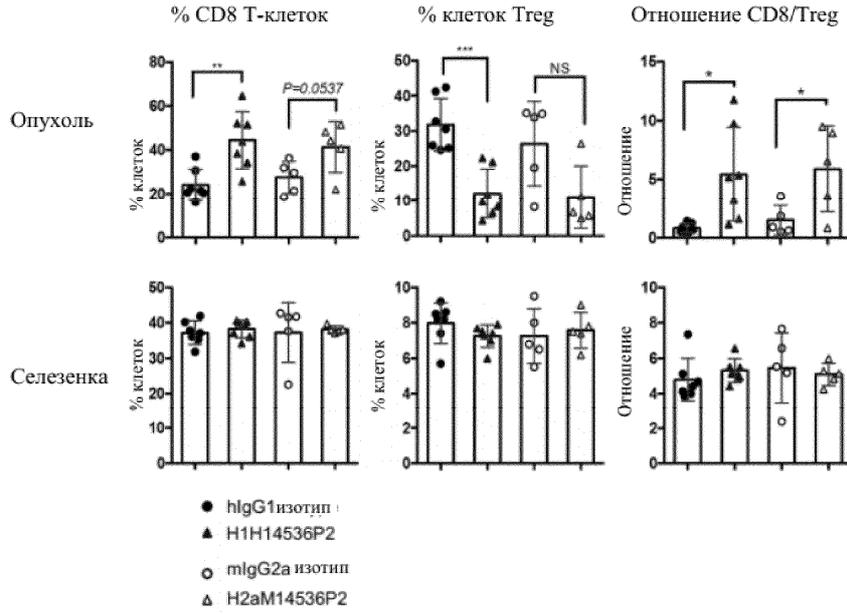
Фиг. 6



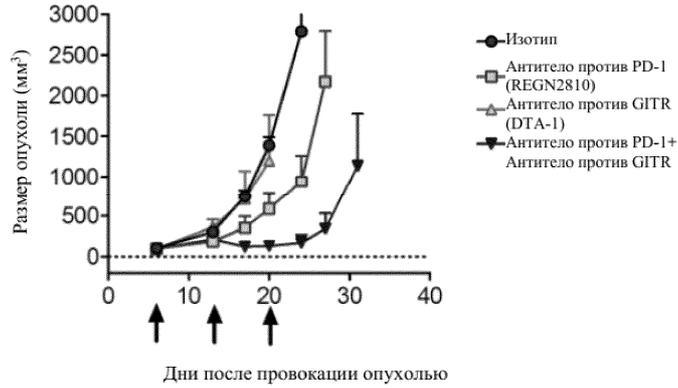
Фиг. 7



Фиг. 8

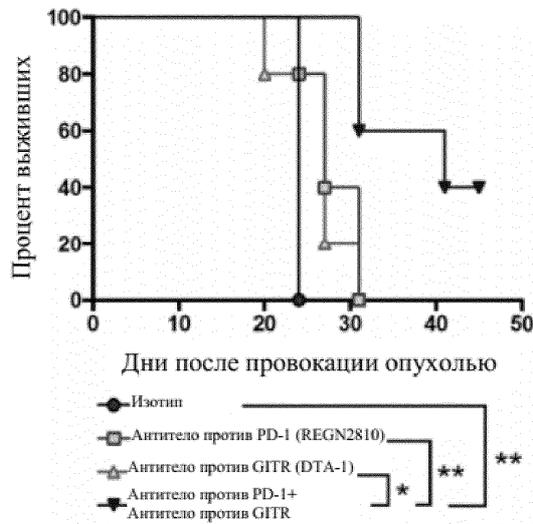


Фиг. 9

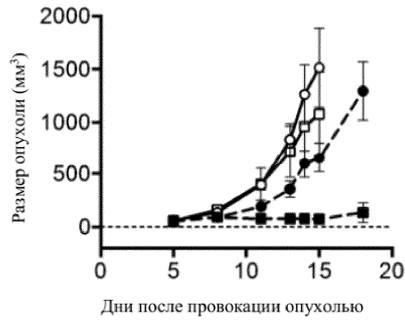


Фиг. 10

Выживание



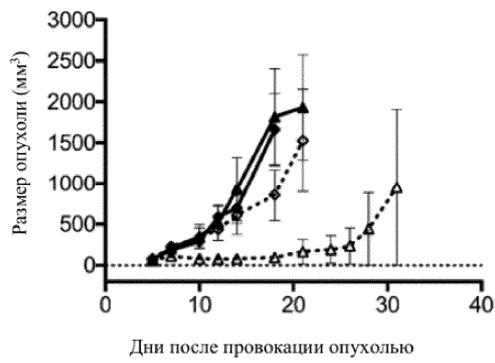
Фиг. 11



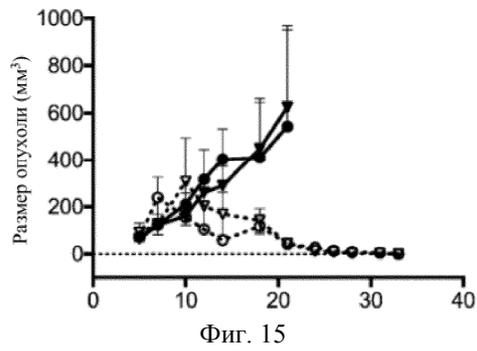
Фиг. 12



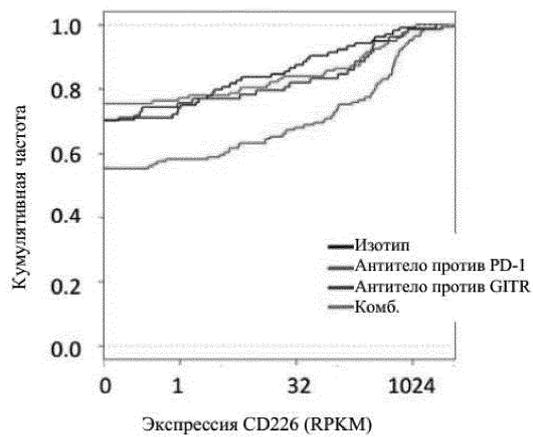
Фиг. 13



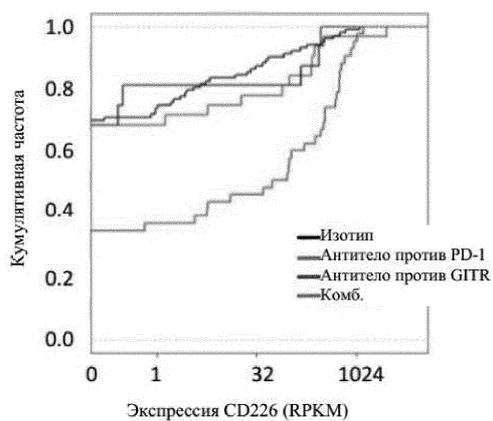
Фиг. 14



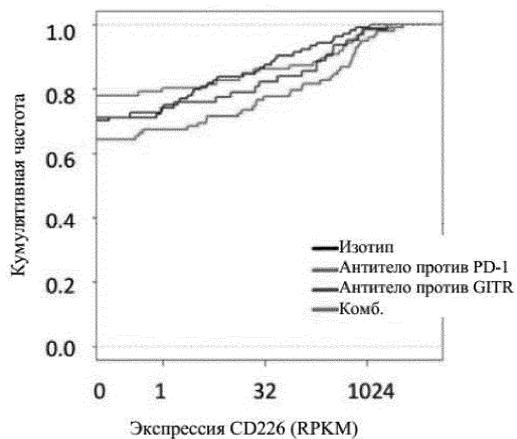
Фиг. 15



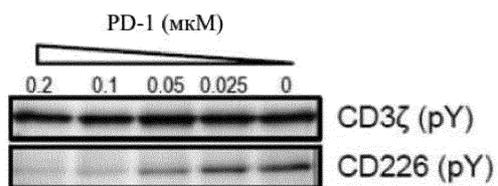
Фиг. 16А



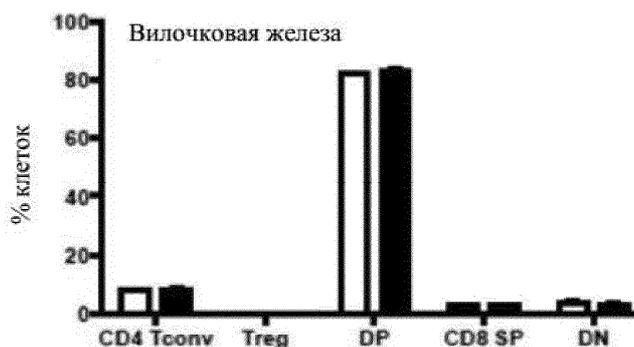
Фиг. 16В



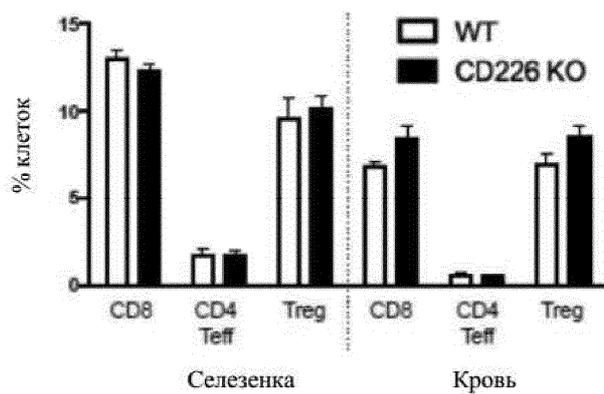
Фиг. 16С



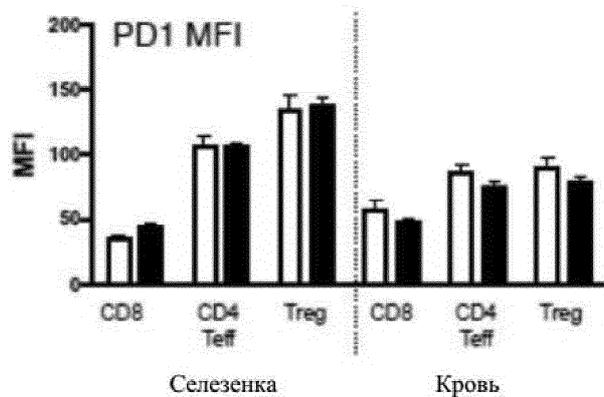
Фиг. 17



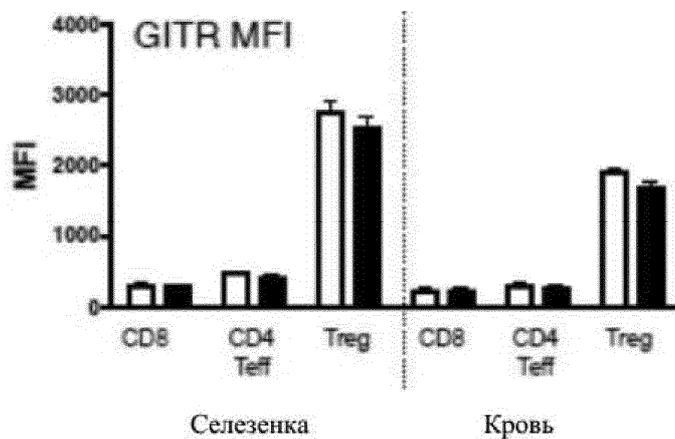
Фиг. 18А



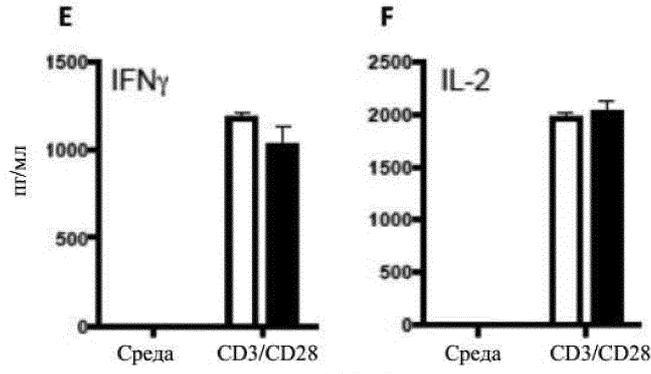
Фиг. 18В



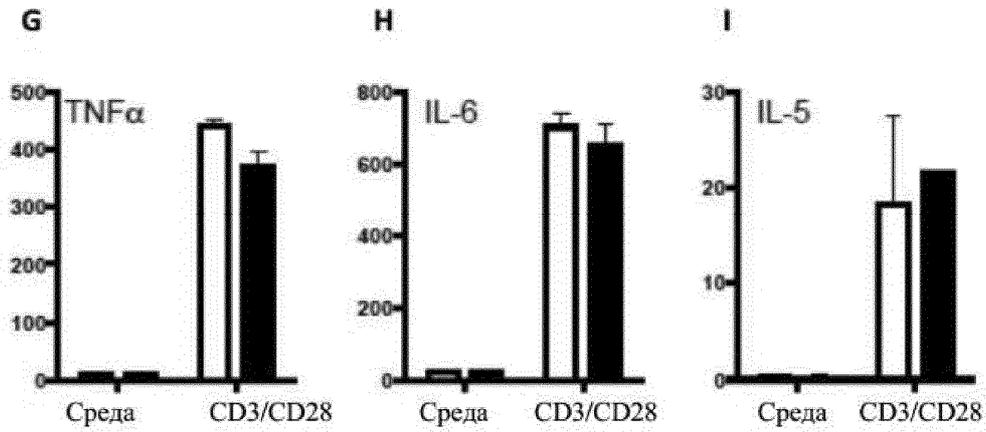
Фиг. 18С



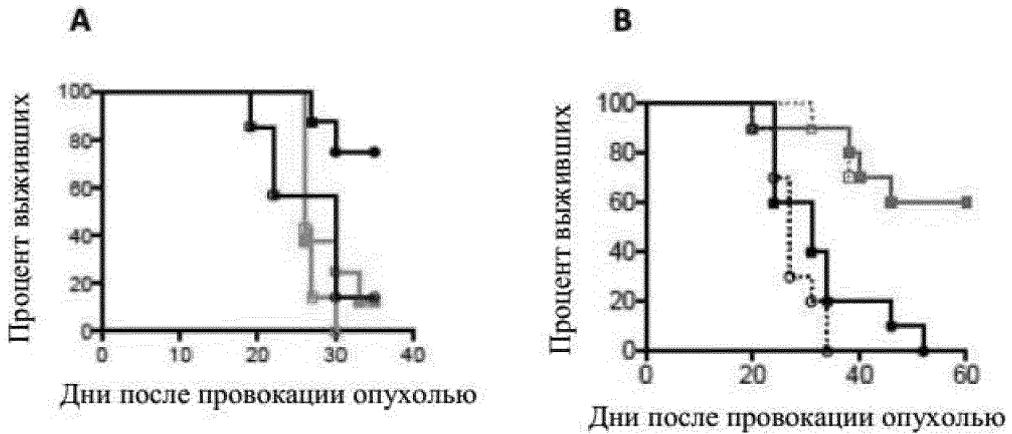
Фиг. 18D



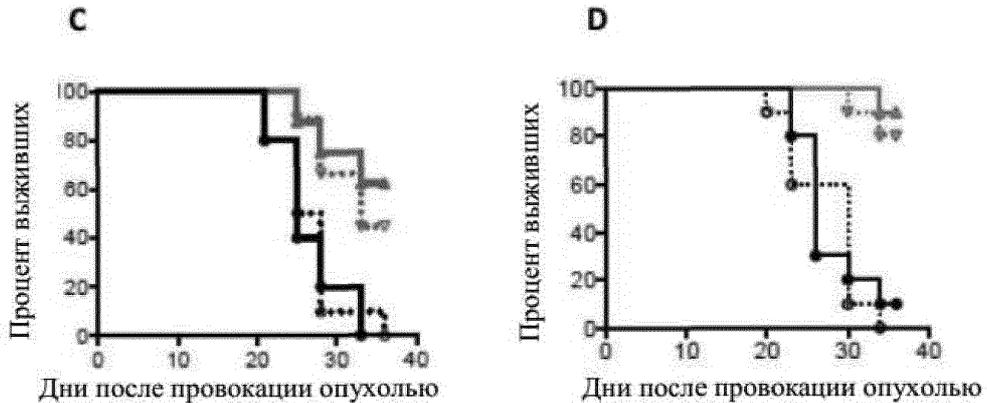
Фиг. 18E, F



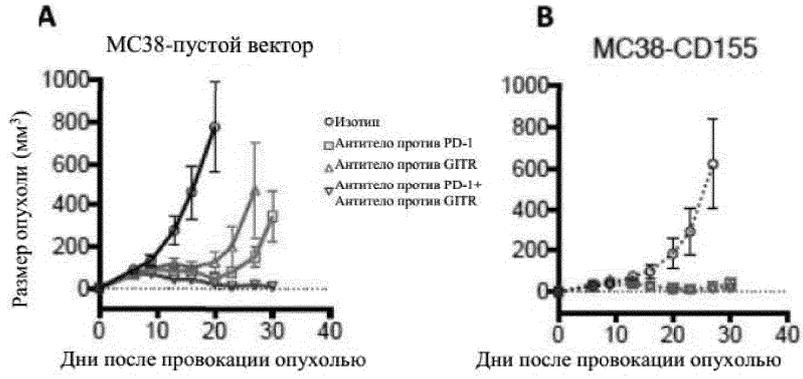
Фиг. 18G-I



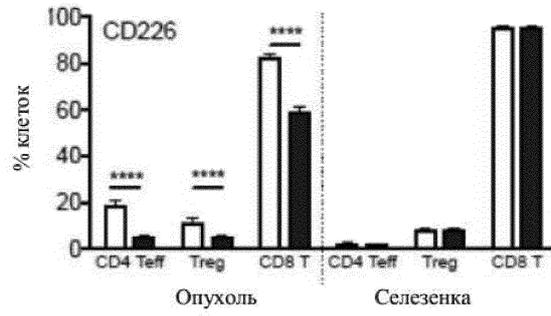
Фиг. 19A, B



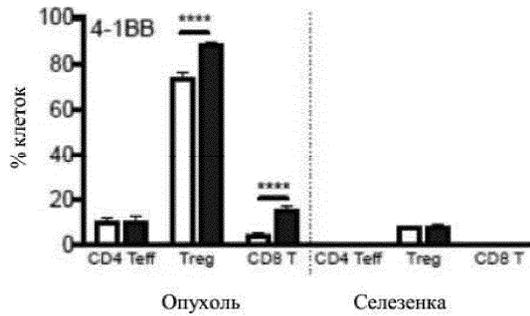
Фиг. 19C, D



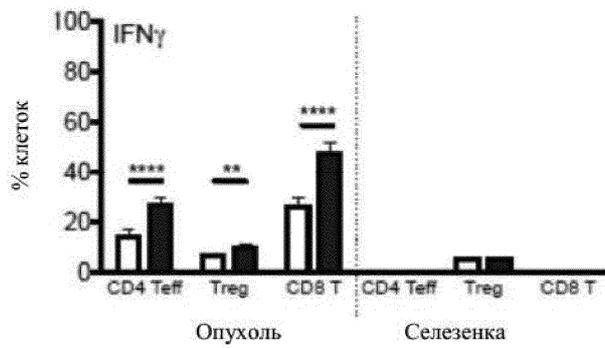
Фиг. 20



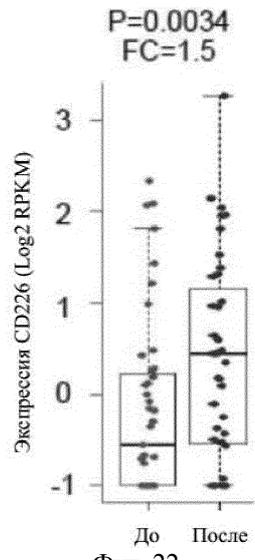
Фиг. 21А



Фиг. 21В



Фиг. 21С



Фиг. 22