

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040077**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.18

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

(21) Номер заявки
201692458

(22) Дата подачи заявки
2015.05.28

(54) АНТИ-GITR АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/004,071; 62/161,250**

(32) **2014.05.28; 2015.05.13**

(33) **US**

(43) **2017.06.30**

(86) **PCT/US2015/032895**

(87) **WO 2015/184099 2015.12.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АГЕНУС ИНК.; МЕМОРИАЛ
СЛОАН-КЕТТЕРИНГ КАНСЕР
СЕНТЕР (US); ЛЮДВИГ
ИНСТИТУТ ФОР КАНСЕР
РЕСЕРЧ ЛТД. (CN)**

(56) **WO-A1-2013039954
WO-A2-2006105021
SYSTEMS R & D: "Human GITR/TNFRSF18
antibody", INTERNET CITATION, 10 June
2010 (2010-06-10), page 1, XP002691136,
Retrieved from the Internet: URL:http://
www.rndsystems.com/pdf/mab689.pdf [retrieved on
2013-01-28], the whole document**

(72) Изобретатель:
**Лежер Оливье (FR), Зиберт Фолькер
(DE), Ван Дийк Марк (NL), Шаер
Дэвид, Тсужи Такемаса, Риттер Герд,
Гонзалес Ана М., Уилсон Николас С.,
Запасоди Роберта, Мергхоуб Таха,
Волчок Джедд Дэвид, Андервуд
Дэннис Дж. (US)**

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(57) В изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с глюкокортикоид-индуцированным рецептором семейства TNFR (GITR), и композиции, содержащие такие антитела. В конкретном аспекте антитела специфически связываются с человеческим GITR и модулируют активность GITR, например повышают, активируют или индуцируют активность GITR. В настоящем изобретении также предложены способы для лечения нарушений, таких как рак и инфекционные заболевания, путем введения антитела, которое специфически связывается с человеческим GITR и модулирует активность GITR, например повышает, активирует или индуцирует активность GITR.

B1**040077****040077****B1**

Перечень последовательностей

Заявка на настоящий патент содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 27 мая 2015 г., называется 3617.009PC02_SL_PatentIn_ST25.txt, а ее размер составляет 747129 байт.

1. Область техники

В настоящем изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с глюкокортикоид-индуцированным рецептором семейства TNFR (GITR), и композиции, содержащие такие антитела. В конкретном аспекте антитела специфически связываются с человеческим GITR и модулируют активность GITR, например, повышают, активируют или индуцируют активность GITR. В настоящем изобретении также предложены способы для лечения нарушений, таких как рак и инфекционные заболевания, путем введения антитела, которое специфически связывается с человеческим GITR и модулирует активность GITR, например, повышает, активирует или индуцирует активность GITR.

2. Уровень техники

Глюкокортикоид-индуцируемый TNFR-подобный белок (GITR), представитель суперсемейства TNFR, экспрессируется во многих компонентах врожденной и адаптивной иммунной системы и стимулирует, как приобретенный, так и врожденный иммунитет (Nocentini G et al. (1994) PNAS 94: 6216-6221; Hanabuchi S et al. (2006) Blood 107: 3617-3623; Nocentini G & Riccardi C (2005) Eur J Immunol 35: 1016-1022; Nocentini G et al. (2007) Eur J Immunol 37: 1165-1169). Он экспрессируется в нескольких клетках и тканях, включая Т-, В-, дендритные клетки (ДК) и естественные клетки-киллеры (NK), и активируется своим лигандом, GITRL, экспрессируемым главным образом на антигенпрезентирующих клетках (АПК), на эндотелиальных клетках и также в опухолевых клетках. Система GITR/GITRL участвует в развитии аутоиммунных/воспалительных ответов и стимулирует ответ на инфекции и опухоли. Например, лечение животных слитым белком GITR-Fc облегчает аутоиммунные/воспалительные заболевания, кроме того, инициация GITR эффективна при лечении вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, а также для повышения иммунного ответа против опухолей (Nocentini G. et al. (2012) Br J Pharmacol 165: 2089-99). Эти эффекты обусловлены несколькими параллельными механизмами, включая коактивацию эффекторных Т-клеток, ингибирование регуляторных Т-клеток (Treg), коактивацию NK-клеток, активацию макрофагов, модуляцию функции дендритных клеток и регуляцию процесса экстравазации. Мембранная экспрессия GITR повышается после активации Т-клеток (Hanabuchi S et al. (2006) выше; Nocentini G & Riccardi C выше). Его инициация коактивирует эффекторные Т-лимфоциты (McHugh RS et al. (2002) Immunity 16: 311-323; Shimizu J et al. (2002) Nat Immunol 3: 135-142; Ronchetti S et al. (2004) Eur J Immunol 34: 613-622; Tone M et al. (2003) PNAS 100: 15059-15064). Активация GITR повышает устойчивость к опухолям и вирусным инфекциям, вовлечена в аутоиммунные/воспалительные процессы и регулирует экстравазацию лейкоцитов (Nocentini G & Riccardi C (2005) выше; Cuzzocrea S et al. (2004) J Leukoc Biol 76: 933-940; Shevach EM & Stephens GL (2006) Nat Rev Immunol 6: 613-618; Cuzzocrea S et al. (2006) J Immunol 177: 631-641; Cuzzocrea S et al. (2007) FASEB J 21: 117-129). Человеческий GITR экспрессируется на очень низких уровнях в периферических (неактивированных) Т-клетках. После активации Т-клеток в течение нескольких дней наблюдается сильная повышающая регуляция в отношении GITR как в клетках CD4⁺, так и CD8⁺ (Kwon B et al. (1999) J Biol Chem 274: 6056-6061; Gurney AL et al. (1999) Curr Biol 9: 215-218; Ronchetti S et al. (2004) выше; Shimizu J et al. (2002) выше; Ji HB et al. (2004) выше; Ronchetti S et al. (2002) Blood 100: 350-352; Li Z et al. (2003) J Autoimmun 21: 83-92), при этом клетки CD4⁺ характеризуются более высокой экспрессией GITR, чем клетки CD8⁺ (Kober J et al. (2008) Eur J Immunol 38(10): 2678-88; Bianchini R et al. (2011) Eur J Immunol 41(8): 2269-78).

С учетом роли человеческого GITR в модуляции иммунных ответов в данном документе предложены антитела, которые специфически связываются с GITR, и применение таких антител для модуляции активности GITR.

3. Сущность изобретения

В одном аспекте в данном документе предложены антитела и их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR). В одном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) частично ингибирует связывание лиганда GITR (например, человеческого GITRL) с GITR согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе (см., например, разделы 6.2.5.2 и 6.2.5.4, ниже). В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 1000 нг/мл ингибирует связывание менее 80% 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Luminex®) в концентрации 5 пг/мл/гранулу по сравнению со связыванием 0,5 нМ GITRL со связанным с гранулами GITR в концентрации 5 пг/мл/гранулу в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание от 40 до 70%, от 50 до 70%, от 50 до 80% или от 40 до 80% GITRL (например, человеческого GITRL) с GITR (например, человеческим GITR). В другом кон-

кретном варианте реализации изобретения по меньшей мере 20% от количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в анализе, включающем: (а) связывание GИTR (например, человеческого GИTR) с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу; (б) инкубацию связанных с GИTR (например, человеческим GИTR) гранул в концентрации 40 гранул/мкл с или без антитела в лунке; (с) добавление в лунку меченого GITRL (например, меченого человеческого GITRL) для получения конечной концентрации 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) и 20 гранул/мкл связанных с GИTR гранул; и (д) выявление меченого GITRL (например, человеческого GITRL), связанного со связанными с GИTR (например, человеческим GИTR) гранулами методом, например, суспензионного матричного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения от 20 до 60%, от 20 до 50%, от 30 до 60% или от 30 до 50% количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) гипервариабельный участок (CDR) 1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 1), в которой

X_1 представляет собой D, E, G или A;

X_2 представляет собой A, V, L, I, P, F, M или Y; и

X_3 представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F или H;

(б) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1IX_2X_3X_4SGX_5X_6X_7YX_8QKFX_9X_{10}$ (SEQ ID NO: 2), в которой

X_1 представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;

X_2 представляет собой R, K, H, Q или A;

X_3 представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или P;

X_4 представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или A;

X_5 представляет собой D, E, G или A;

X_6 представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;

X_7 представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I, P или A;

X_8 представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X_9 представляет собой K, R, H, Q или A; и

X_{10} представляет собой D, E, G или A;

(с) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $SGTVRGX_1X_2X_3$ (SEQ ID NO: 3), в которой

X_1 представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S;

X_2 представляет собой A или D; и

X_3 представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V;

(д) CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $KSSQSX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7KX_8Y LX_9$ (SEQ ID NO: 4), где

X_1 представляет собой L, A, V, I, P, F или M;

X_2 представляет собой L, A, V, I, P, F, M или S;

X_3 представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X_4 представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;

X_5 представляет собой G, N, Q, S, T, C, W, Y или A;

X_6 представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X_7 представляет собой Q, G, N, S, T, C, W, Y или A;

X_8 представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A; и

X_9 представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или A;

(е) VL CDR2, содержащую, состоящую или преимущественно состоящую из аминокислотной последовательности $X_1ASTRX_2X_3$ (SEQ ID NO: 5), где

X_1 представляет собой W, G, N, Q, S, T, C, Y, F, H или A;

X_2 представляет собой E, D или A; и

X_3 представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A; и

(ф) VL CDR3, содержащую, состоящую или преимущественно состоящую из аминокислотной последовательности $QX_1X_2YX_3X_4PYT$ (SEQ ID NO: 6), где

X_1 представляет собой N, G, Q, S, T, C, W или Y;

X_2 представляет собой D, E или Y; и

X_3 представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A, и

X_4 представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H, L или A.

В других вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 7), в которой

X_1 представляет собой D, E или G;

X_2 представляет собой A или V; и

X_3 представляет собой Y или H;

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$ (SEQ ID NO: 8), в которой

X_1 представляет собой V или L;

X_2 представляет собой R, K или Q;

X_3 представляет собой Y или F;

X_4 представляет собой D, E или G;

X_5 представляет собой V или L;

X_6 представляет собой T или S;

X_7 представляет собой K, R или Q; и

X_8 представляет собой D, E или G;

(c) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 9);

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $KSSQSLLNSX_1NQKNYLX_2$ (SEQ ID NO: 10), в которой

X_1 представляет собой G или S; и

X_2 представляет собой T или S;

(e) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности WASTRES (SEQ ID NO: 11); и

(f) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QNX_1YSX_2PYT (SEQ ID NO: 12), в которой

X_1 представляет собой D или E; и

X_2 представляет собой Y, F или S.

В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее:

(a) гиперварибельный участок (CDR) 1 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 1), в которой

X_1 представляет собой D, E, G или A;

X_2 представляет собой A, V, L, I, P, F, M или Y; и

X_3 представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F или H;

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1IX_2X_3X_4SGX_5X_6X_7YX_8QKFX_9X_{10}$ (SEQ ID NO: 2), в которой

X_1 представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;

X_2 представляет собой R, K, H, Q или A;

X_3 представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или P;

X_4 представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или A;

X_5 представляет собой D, E, G или A;

X_6 представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;

X_7 представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I, P или A;

X_8 представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X_9 представляет собой K, R, H, Q или A; и

X_{10} представляет собой D, E, G или A;

(c) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 3), в которой

X_1 представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S;

X_2 представляет собой A или D; и

X_3 представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $KSSQSX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7KX_8Y LX_9$ (SEQ ID NO: 4), где

X_1 представляет собой L, A, V, I, P, F или M;

X_2 представляет собой L, A, V, I, P, F, M или S;

X_3 представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X₄ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;
 X₅ представляет собой G, N, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₆ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₇ представляет собой Q, G, N, S, T, C, W, Y или A;
 X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A; и
 X₉ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или A;

(е) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁ASTRX₂X₃ (SEQ ID NO: 5), где

X₁ представляет собой W, G, N, Q, S, T, C, Y, F, H или A;
 X₂ представляет собой E, D или A; и
 X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A; и

(f) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QX₁X₂YX₃X₄PYT (SEQ ID NO: 6), где

X₁ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W или Y;
 X₂ представляет собой D, E или Y; и
 X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A, и

X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H, L или A. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 19-23 и 117-119. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 24-33 и 120-188. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 115 и 194. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 34 и 189. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 101-104. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17 и 105. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 106-109, 192 и 193. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 антитела из табл. 2. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 антитела из табл. 6. В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела из табл. 1. В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела из табл. 5. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент частично ингибирует связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с G1TR (например, человеческим G1TR) согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе (см., например, разделы 6.2.5.2 и 6.2.5.4, ниже). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 1000 нг/мл ингибирует связывание менее 80% 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) со связанным с гранулами G1TR (например, человеческим G1TR, связанным с гранулами Luminex®) в концентрации 5 пг/мл/гранулу по сравнению со связыванием 0,5 нМ GITRL со связанным с гранулами G1TR в концентрации 5 пг/мл/гранулу в отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание от 40 до 70%, от 50 до 70%, от 50 до 80% или от 40 до 80% GITRL (например, человеческого GITRL) с G1TR (например, человеческим G1TR). В конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20% от количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с G1TR (например, человеческим G1TR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с G1TR (например, человеческим G1TR) в присутствии

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в анализе, включающем следующие этапы: (а) связывание GITR (например, человеческого GITR) с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу; (b) инкубацию связанных с GITR (например, человеческим GITR) гранул в концентрации 40 гранул/мкл с или без антитела в лунке; (c) добавление в лунку меченого GITRL (например, меченого человеческого GITRL) для получения конечной концентрации 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) и 20 гранул/мкл связанных с GITR гранул; и (d) выявление меченого GITRL (например, человеческого GITRL), связанного со связанными с GITR (например, человеческим GITR) гранулами методом, например, суспензионного матричного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения от 20 до 60%, от 20 до 50%, от 30 до 60% или от 30 до 50% количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GITR (например, человеческим GITR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее:

(а) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 7), в которой

X_1 представляет собой D, E или G;

X_2 представляет собой A или V; и

X_3 представляет собой Y или H;

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$ (SEQ ID NO: 8), в которой

X_1 представляет собой V или L;

X_2 представляет собой R, K или Q;

X_3 представляет собой Y или F;

X_4 представляет собой D, E или G;

X_5 представляет собой V или L;

X_6 представляет собой T или S;

X_7 представляет собой K, R или Q; и

X_8 представляет собой D, E или G;

(c) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 9);

(d) CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL) содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности $KSSQSLLNSX_1NQKNYLX_2$ (SEQ ID NO: 10), в которой

X_1 представляет собой G или S; и

X_2 представляет собой T или S;

(e) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности WASTRES (SEQ ID NO: 11); и

(f) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QNX_1YSX_2PYT (SEQ ID NO: 12), в которой

X_1 представляет собой D или E; и

X_2 представляет собой Y, F или S.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 19-23 и 117-119. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из 35 и 116. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 24-33 и 120-188. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 115 и 194. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 34 и 189. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 101-104. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 17 и 105. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 106-109, 192 и 193. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 антитела из табл. 2. В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не предотвращает связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GИTR (например, человеческим GИTR) согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе (см., например, разделы 6.2.5.2 и 6.2.5.4, ниже). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 1000 нг/мл ингибирует связывание менее 80% 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) со связанным с гранулами GИTR (например, человеческим GИTR, связанным с гранулами Lumindex®) в концентрации 5 пг/мл/гранулу по сравнению со связыванием 0,5 нМ GITRL со связанным с гранулами GИTR в концентрации 5 пг/мл/гранулу в отсутствие анти-GИTR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание от 40 до 70%, от 50 до 70%, от 50 до 80% или от 40 до 80% GITRL (например, человеческого GITRL) с GИTR (например, человеческим GИTR). В конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20% от количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в анализе, включающем следующие этапы: (а) связывание GИTR (например, человеческого GИTR) с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу; (б) инкубацию связанных с GИTR (например, человеческим GИTR) гранул в концентрации 40 гранул/мкл с или без антитела в лунке; (с) добавление в лунку меченого GITRL (например, меченого человеческого GITRL) для получения конечной концентрации 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) и 20 гранул/мкл связанных с GИTR гранул; и (д) выявление меченого GITRL (например, человеческого GITRL), связанного со связанными с GИTR (например, человеческим GИTR) гранулами методом, например, суспензионного матричного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения от 20 до 60%, от 20 до 50%, от 30 до 60% или от 30 до 50% количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с человеческим GИTR, содержащее: (а) CDR1 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность DYAMY (SEQ ID NO: 13); (б) VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность VIRTYSGDVTYNQKFKD (SEQ ID NO: 14); (с) VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 15); (д) CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность KSSQSLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 16); (е) VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO: 17); и (ф) VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 18). В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с человеческим GИTR, содержащее VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR 3 антитела 22 из табл. 1 и табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент частично ингибирует связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GИTR (например, человеческим GИTR) согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе (см., например, разделы 6.2.5.2 и 6.2.5.4, ниже). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 1000 нг/мл ингибирует менее 80% GИTR, связанного с гранулами (например, человеческого GИTR, связанного с гранулами Lumindex®), в концентрации 5 пг/мл/гранулу по сравнению со связыванием 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) со связанным с гранулами GИTR (например, человеческим GИTR, связанным с гранулами Lumindex®) в концентрации 5 пг/мл/гранулу в отсутствие анти-GИTR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует от 50 до 70% связывания человеческого GITRL с человеческим GИTR. В конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20% от количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GИTR (например, человеческим GИTR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в анализе, включающем следующие этапы: (а) связывание GИTR (например, человеческого GИTR) с

гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу; (b) инкубацию связанных с GITR (например, человеческим GITR) гранул в концентрации 40 гранул/мкл с или без антитела в лунке; (c) добавление в лунку меченого GITRL (например, меченого человеческого GITRL) для получения конечной концентрации 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) и 20 гранул/мкл связанных с GITR гранул; и (d) выявление меченого GITRL (например, человеческого GITRL), связанного со связанными с GITR (например, человеческим GITR) гранулами методом, например, суспензионного матричного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения от 20 до 60%, от 20 до 50%, от 30 до 60% или от 30 до 50% количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GITR (например, человеческим GITR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации изобретения от 30 до 50% количества человеческого GITRL, которое связывается с человеческим GITR в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с человеческим GITR в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является агонистическим.

В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 203. В некоторых вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 215-389. В другом варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую полученные от человека каркасные области. В другом варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит каркасную область вариабельной области тяжелой цепи, которая представляет собой или получена из аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим геном, при этом аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 601), IGHV1-3*01 (SEQ ID NO: 602), IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 603), IGHV1-18*01 (SEQ ID NO: 604), IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 605) и IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 606). В конкретных вариантах реализации изобретения каркасная область вариабельной области тяжелой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, содержащей до 10 аминокислотных замен, делеций и/или вставок, предпочтительно до 10 аминокислотных замен. В конкретном варианте реализации изобретения каркасная область вариабельной области тяжелой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными остатками, которые были замещены аминокислотой, находящейся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариабельной области тяжелой цепи. В конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит каркасную область вариабельной области тяжелой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 601, при этом по меньшей мере одна, две, три, четыре или пять (в определенных вариантах реализации изобретения до 10) аминокислот аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 601 замещены аминокислотой, находящейся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариабельной области тяжелой цепи. В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена находится в аминокислотной позиции, выбранной из группы, состоящей из 24, 48, 67, 71, 73 и 94, причем аминокислотная позиция каждого представителя группы указана в соответствии с нумерацией Кабата. В конкретных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 24G, 48I, 67A, 71V, 73K и 94K, причем аминокислотная позиция каждого представителя группы указана в соответствии с нумерацией Кабата.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206 и SEQ ID NO: 215-389. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее

последовательность вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 553, 554 и от 567 до 570. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 581 и 582.

В другом варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит последовательность вариательной области легкой цепи, содержащую одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205. В другом варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариательной области легкой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности вариательной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 400-518. В другом варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариательной области легкой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 519. В другом варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит вариательную область легкой цепи, содержащую полученные от человека каркасные области. В другом варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит каркасную область вариательной области легкой цепи, которая представляет собой или получена из аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим геном, при этом аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 607) и IGKV3-7*02 (SEQ ID NO: 608). В конкретных вариантах реализации изобретения каркасная область вариательной области легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности за исключением наличия до 10 аминокислотных замен, делеций и/или вставок, предпочтительно до 10 аминокислотных замен. В конкретном варианте реализации изобретения каркасная область вариательной области легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными остатками, которые были замещены аминокислотой, находящейся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариательной области легкой цепи. В другом варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит каркасную область вариательной области легкой цепи, которая представляет собой или получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 607 или SEQ ID NO: 608, при этом по меньшей мере одна, две, три, четыре или пять (в определенных вариантах реализации изобретения до 10) аминокислот аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 607 или SEQ ID NO: 608 замещены аминокислотой, находящейся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариательной области легкой цепи. В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена находится в аминокислотной позиции 87, причем аминокислотная позиция указана в соответствии с нумерацией Кабата. В конкретных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену 87H, причем аминокислотная позиция указана в соответствии с нумерацией Кабата. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержащее последовательность вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 400-518. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержащее последовательность вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 519. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержащее последовательность вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержащее последовательность вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207. В другом конкретном ва-

рианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 555, 556 и 571-576.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности антитела из таблицы на фиг. 23 или любой из фиг. 24A-24C. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности антитела из табл. 17. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208.

В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 и каркасные области, полученные из человеческого иммуноглобулина, при этом VH CDR1 содержит, состоит из или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности DYAMY (SEQ ID NO: 13), VH CDR2 содержит, состоит из или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности VIR-TYSGDVTYNQKFKD (SEQ ID NO: 14), а VH CDR3 содержит, состоит из или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 15). В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3 и каркасные области, полученные из человеческого иммуноглобулина, при этом VL CDR1 содержит, состоит из или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 16), VL CDR2 содержит, состоит из или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности WASTRES (SEQ ID NO: 17), а VL CDR3 содержит, состоит из или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 18). В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 и 400-518. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 519. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент частично ингибирует связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GITR (например, человеческим GITR) согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе (см., например, разделы 6.2.5.2 и 6.2.5.4 ниже). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 1000 нг/мл ингибирует связывание менее 80% 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Luminex®) в концентрации 5 пг/мл/гранулу по сравнению со связыванием 0,5 нМ GITRL со связанным с гранулами GITR в концентрации 5 пг/мл/гранулу в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе. В конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20% от количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GITR (например, человеческим GITR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в анализе, включающем следующие этапы: (а) связывание GITR (например, человеческого

GITR) с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу; (b) инкубацию связанных с GITR (например, человеческим GITR) гранул в концентрации 40 гранул/мкл с или без антитела в лунке; (c) добавление в лунку меченого GITRL (например, меченого человеческого GITRL) для получения конечной концентрации 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) и 20 гранул/мкл связанных с GITR гранул; и (d) выявление меченого GITRL (например, человеческого GITRL), связанного со связанными с GITR (например, человеческим GITR) гранулами методом, например, суспензионного матричного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения от 20 до 60%, от 20 до 50%, от 30 до 60% или от 30 до 50% количества GITRL (например, человеческого GITRL), которое связывается с GITR (например, человеческим GITR) в отсутствие антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем VH и VL содержат аминокислотную последовательность антитела с фиг. 23 или любой из фиг. 24A-24C. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем VH и VL содержат аминокислотную последовательность антитела из табл. 17.

В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит константные области тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения константная область тяжелой цепи выбрана из группы человеческих иммуноглобулинов, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. В определенных вариантах реализации изобретения константная область легкой цепи выбрана из группы человеческих иммуноглобулинов, состоящей из IgGκ и IgGλ. В конкретном варианте реализации изобретения IgG1 представляет собой нефукозилированный IgG1. В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело представляет собой IgG1, который содержит мутацию N297A или N297Q. В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело представляет собой IgG4, который содержит мутацию S228P. В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело представляет собой IgG2, который содержит мутацию C127S. В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 557-562. В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 583 и 584. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 557-560 с аминокислотной заменой N на A или Q в аминокислотной позиции 180. В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 588-591. В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 563-566.

В конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 553, 554 и 567-570; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 555, 556 и 571-576. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 553; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 556. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 554; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 556. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 581; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 556. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном доку-

- 11 -

SEQ ID NO: 701. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим GITR, причем человеческий GITR содержит остатки 26-241 SEQ ID NO: 701, и при этом антитело связывается по меньшей мере с одним остатком в аминокислотной последовательности, образованной остатками 60-63 SEQ ID NO: 701. В одном варианте реализации изобретения антитело связывается по меньшей мере с одним остатком, выбранным из группы, состоящей из остатков 60, 62 и 63 SEQ ID NO: 701. В одном варианте реализации изобретения антитело связывается по меньшей мере с одним остатком, выбранным из группы, состоящей из остатков 62 и 63 SEQ ID NO: 701. В одном варианте реализации изобретения антитело активирует или повышает активность человеческого GITR. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено выделенное антитело, которое специфически связывает человеческий GITR, причем человеческий GITR содержит остатки 26-241 SEQ ID NO: 701, и при этом антитело связывает эпитоп человеческого GITR, содержащий по меньшей мере один из остатков 60 или 63 SEQ ID NO: 701. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим GITR, при этом антитело проявляет, по сравнению со связыванием с человеческим GITR, сниженное или отсутствующее связывание с белком, идентичным человеческому GITR, за исключением наличия аминокислотной замены D60A или G63A. В одном варианте реализации изобретения антитело индуцирует, активирует или повышает активность человеческого GITR. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом за связывание с GITR (например, человеческим GITR). В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) в той же степени, в какой описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует само с собой за связывание с GITR (например, человеческим GITR). В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом за связывание с GITR (например, человеческим GITR), при этом первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание в анализе, включающем следующие этапы: (а) инкубацию в контейнере GITR-трансфицированных клеток с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в немеченой форме; (b) добавление к клеткам в контейнере описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в меченой форме и инкубацию клеток в контейнере; и (с) выявление связывания описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в меченой форме с клетками. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом за связывание с GITR (например, человеческим GITR), при этом конкурентное проявление является как снижение связывания первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с GITR (например, человеческим GITR) более чем на 80% (например, 85, 90, 95 или 98% либо от 80 до 85%, от 80 до 90%, от 85 до 90% или от 85 до 95%).

В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), активирует, индуцирует или повышает активность GITR (например, человеческого GITR). В конкретных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), представляет собой гуманизированное антитело, мышиное антитело или химерное антитело. В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), связывается с GITR (например, человеческим GITR) с K_d в диапазоне от около 0,5 нМ до 5 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит выявляемую метку. В конкретных вариантах реализации изобретения предложенное в данном документе антитело является выделенным.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует, активирует или повышает активность человеческого GITR в клетке независимо от инициации РТК. В конкретных вариантах реализации изобретения клетка представляет собой Т-клетку. В конкретных вариантах реализации изобретения клетка не представляет собой Т-клетку. В конкретных вариантах реализации изобретения клетка выбрана из группы, состоящей из В-клетки, плазматической клетки, клетки памяти, естественной клетки-киллера, гранулоцита, нейтрофила, эозинофила, базофила, тучной клетки, моноцита, дендритной клетки, плазматцитоидной дендритной клетки, НКТ-клетки и макрофага. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует, активирует или повышает активность NF-κB независимо от инициации РТК. В определенных вариантах реализации изобретения

бретения активность NF-κB можно оценить, например, в анализе, включающем следующие этапы: (а) инкубацию Т-клеток (например, клеток Jurkat), экспрессирующих репортерную конструкцию NF-κB-люцифераза (например, конструкцию GloResponse NF-κB-luc2P) и GITR (например, человеческий GITR), с описанным в данном документе антителом или изотипическим контрольным антителом с концентрацией антитела, составляющей, например, 12,5, 10, 5, 2,5, 1,25 или 0,625 мкг/мл, в отсутствие анти-CD3 антитела; и (b) считывание сигнала люциферазы, например, через 2, 5, 6, 8 или 18 ч инкубации при помощи, например, многометочного ридера EnVision 2100, при этом положительный сигнал люциферазы по сравнению с изотипическим контрольным антителом свидетельствует об активности NF-κB. В конкретном варианте реализации изобретения сигнал люциферазы считывают через 5 ч инкубации.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает процентное содержание полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток. В конкретных вариантах реализации изобретения повышение процентного содержания полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток можно оценить, например, в анализе, включающем следующие этапы: (а) инкубации, например, человеческих МКПК, например, с анти-CD3 антителом в разных субоптимальных концентрациях (например, 0,3-5 мкг/мл); и, например, описанным в данном документе антителом, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), например, при 5 мкг/мл, или изотипическим контрольным антителом в течение, например, 3-4 дней при 37°C и 5% CO₂; (b) обработки клеток, например, брэфелдином А в течение, например, 6 ч при 37°C и 5% CO₂; (c) окрашивания поверхности клеток при помощи, например, анти-CD3 антитела, анти-CD4 антитела и анти-CD8α антитела; (d) внутриклеточного окрашивания при помощи, например, анти-ИФНγ антитела и анти-ФНОα антитела; и (e) определения процентного содержания полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В конкретных вариантах реализации изобретения полифункциональные Т-клетки (ИФНγ+ ФНОα+) выбраны из группы, состоящей из полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток CD4+ и полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток CD8+. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), при связывании с активированными регуляторными Т-клетками связывается с активизирующими Fc-гамма-рецепторами, выбранными из группы, состоящей из CD16, CD32A и CD64, в большей степени (например, большей в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 раз или 100 раз), чем антитело при связывании с активированными эффекторными Т-клетками связывается с активизирующими Fc-гамма-рецепторами, выбранными из группы, состоящей из CD16, CD32A и CD64, согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, репортерный анализ Fc-гамма-рецептора IIIA (CD16) или как описано в примерах, ниже). В конкретных вариантах реализации изобретения активирующие Fc-гамма-рецепторы экспрессируются на клетке, выбранной из группы, состоящей из миелоидных эффекторных клеток и лимфоцитарных эффекторных клеток. В конкретном варианте реализации изобретения активирующий Fc-гамма-рецептор представляет собой CD16.

В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), при связывании с активированными регуляторными Т-клетками приводит к более сильной активации активирующих Fc-гамма-рецепторов, выбранных из группы, состоящей из CD16, CD32A и CD64, чем антитело при связывании с активированными эффекторными Т-клетками приводит к активации активирующих Fc-гамма-рецепторов, выбранных из группы, состоящей из CD16, CD32A и CD64. В конкретных вариантах реализации изобретения активация активирующих Fc-гамма-рецепторов при связывании описанного в данном документе антитела, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), с активированными регуляторными Т-клетками является по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз более сильной, чем активация активирующих Fc-гамма-рецепторов при связывании описанного в данном документе антитела, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), с активированными эффекторными Т-клетками, согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, репортерный анализ Fc-гамма-рецептора IIIA (CD16) или как описано в примерах, ниже). В конкретных вариантах реализации изобретения активирующие Fc-гамма-рецепторы экспрессируются на клетке, выбранной из группы, состоящей из миелоидных эффекторных клеток и лимфоцитарных эффекторных клеток. В конкретном варианте реализации изобретения активирующий Fc-гамма-рецептор представляет собой CD16.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает поверхностную экспрессию OX40 и/или PD-1 в активированных Т-клетках по меньшей мере в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз согласно оценке методами, описанными в данном документе и/или известными

ми специалисту в данной области техники, по сравнению с поверхностной экспрессией OX40 и/или PD-1 в активированных Т-клетках без описанного в данном документе антитела.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи либо легкую цепь и/или тяжелую цепь описанного в данном документе антитела. В конкретном варианте реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменную область тяжелой цепи, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 209. В другом конкретном варианте реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменную область легкой цепи, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 210 или SEQ ID NO: 211. В конкретных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты является выделенной. В определенных вариантах реализации изобретения вектор (например, выделенный вектор) содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи либо легкую цепь и/или тяжелую цепь описанного в данном документе антитела. В определенных вариантах реализации изобретения клетка-хозяин содержит молекулу нуклеиновой кислоты или вектор. Примеры клеток-хозяев включают клетки *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, дрожжей, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10, клетки растений, клетки насекомых и клетки человека в тканевой культуре. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), включающий культивирование клетки-хозяина так, чтобы происходила экспрессия нуклеиновой кислоты и вырабатывалось антитело.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения стимуляции Т-клеток, включающий инкубацию *ex vivo* Т-клеток, которые стимулировали агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ активации Т-клеток, включающий инкубацию *ex vivo* Т-клеток с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает инкубацию *ex vivo* Т-клеток с агентом, стимулирующим РТК-комплекс (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), до, одновременно или после инкубации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки были выделены из организма субъекта. В определенных вариантах реализации изобретения субъекту проводят инфузию стимулированных и/или активированных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки, которые инфузируют субъекту, являются аутологичными или аллогенными. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ преимущественной экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток (например, Т-клеток CD4⁺ и/или CD8⁺) и/или эффекторной функции Т-клеток, включающий инкубацию *ex vivo* Т-клеток с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает инкубацию Т-клеток с агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), до, одновременно или после инкубации Т-клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки были выделены из организма субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает инфузию субъекту Т-клеток после их экспансии и/или после повышения их эффекторной функции. В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки, которые инфузируют субъекту, являются аутологичными или аллогенными. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток CD8⁺, включающий инкубацию *ex vivo* Т-клеток с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает инкубацию Т-клеток с агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), до, одновременно или после инкубации Т-клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки были выделены из организма субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополни-

тельно включает инфузию субъекту Т-клеток после их экспансии и/или после повышения их эффекторной функции. В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки, которые инфузируют субъекту, являются аутологичными или аллогенными. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток CD4+, включающий инкубацию *ex vivo* Т-клеток с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает инкубацию Т-клеток с агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), до, одновременно или после инкубации Т-клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки были выделены из организма субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает инфузию субъекту Т-клеток после их экспансии и/или после повышения их эффекторной функции. В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки, которые инфузируют субъекту, являются аутологичными или аллогенными. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ активации G1TR или активации NF-κB, включающий инкубацию *ex vivo* Т-клеток, которые не стимулировали агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки были выделены из организма субъекта. В определенных вариантах реализации изобретения субъекту проводят инфузию активированных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки, которые инфузируют субъекту, являются аутологичными или аллогенными. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ активации Т-клеток независимо от инициации РТК, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ индукции, активации или повышения активности NF-κB независимо от инициации РТК, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения процентного содержания полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения поверхностной экспрессии OX40 и/или PD-1 в активированных Т-клетках, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложены фармацевтические композиции, содержащие описанные в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или клетку-хозяина и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическую композицию можно применять для модуляции иммунного ответа и/или лечения и/или предотвращения нарушения, такого как рак или инфекционное заболевание. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции. В конкретном варианте реализации изобретения происходит повышение или индукция иммунного ответа. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток и/или эффекторной функции Т-клеток у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток CD8+ у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено применение описанного в данном документе антитела в производстве медикамента для лечения рака. В определенных вариантах реализации изобретения предложено описанное в данном документе антитело для применения в лечении рака. В определенных вариантах реализации изобретения предложено применение описанной в данном документе фармацевтической композиции в производстве медикамента для лечения рака. В определенных вариантах реализации изобретения предложена описанная в данном документе фармацевтическая композиция для применения в лечении рака. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции. В определенных вариантах реализации изобретения

способ лечения рака дополнительно включает введение субъекту противоракового агента. Примеры противораковых агентов, которые можно вводить субъекту в комбинации с описанной в данном документе фармацевтической композицией, описаны в разделе 5.4, ниже (например, разделы 5.4.1 и 5.4.1.1). В конкретном варианте реализации изобретения противораковый агент представляет собой вакцину. В конкретном варианте реализации изобретения вакцина содержит пептидный комплекс белка теплового шока (HSPPC), в котором HSPPC содержит белок теплового шока (например, белок gp96), образующий комплекс с одним или более антигенными пептидами (например, опухолеассоциированными антигенными пептидами). В определенных вариантах реализации изобретения рак, лечение которого проводят, представляет собой плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, ходжкинскую или неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия, миелому, карциному слюнных желез, рак почки, базальноклеточную карциному, меланому, рак простаты, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода или тип рака головы и шеи. В определенных вариантах реализации изобретения рак, лечение которого проводят, представляет собой десмопластическую меланому, воспалительный рак молочной железы, тимому, рак прямой кишки, рак анального канала или хирургически операбельную или хирургически неоперабельную глиому ствола головного мозга. В конкретном варианте реализации изобретения субъект, лечение которого проводят, является человеком. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ активации Т-клеток независимо от инициации РТК у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ индукции, активации или повышения активности NF- κ B независимо от инициации РТК у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения процентного содержания полифункциональных (ИФН γ + ФНО α +) Т-клеток у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения поверхностной экспрессии OX40 и/или PD-1 в активированных Т-клетках у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции.

Описанное в данном документе антитело можно применять в комбинации с ингибитором ИДО для лечения рака. В одном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции, при этом способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО). Описанный в данном документе ингибитор ИДО для применения в лечении рака находится в твердой лекарственной форме фармацевтической композиции, такой как таблетка, пилюля или капсула, при этом фармацевтическая композиция содержит ингибитор ИДО и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Следовательно, описанное в данном документе антитело и описанный в данном документе ингибитор ИДО можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном варианте реализации изобретения антитело вводят парентерально, а ингибитор ИДО вводят перорально. В конкретных вариантах реализации изобретения ингибитор выбран из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corporation), F001287 (Flexus Biosciences), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). Эпикадостат был описан в публикации согласно РСТ № WO 2010/005958, которая в полном объеме во всех смыслах включена в данный документ посредством ссылки. В одном варианте реализации изобретения ингибитор представляет собой эпикадостат. В другом варианте реализации изобретения ингибитор представляет собой F001287. В другом варианте реализации изобретения ингибитор представляет собой индоксимод. В другом варианте реализации изобретения ингибитор представляет собой NLG919.

Описанное в данном документе антитело можно применять в комбинации с нацеленным на контрольные точки агентом для лечения рака. В одном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции, при этом способ дополнительно включает введение субъекту нацеленного на контрольные точки агента. В некоторых вариантах реализации изобретения нацеленный на контрольные точки агент выбран из группы, состоящей из антагониста PD-1 (например, антагонистического анти-PD-1 антитела), антагониста PD-L1 (например, антагонистического анти-PD-L1 антитела), антагониста PD-L2 (например, антагонистического анти-PD-L2 антитела), антагониста CTLA-4 (например, антагонистического анти-CTLA-4 антитела), антагониста TIM-3 (например, антагонистического анти-TIM-3 антитела), антагониста LAG-3 (например, антагонистического анти-LAG-3 антитела) и агониста OX40 (например, агонистического анти-OX40 антитела). В некоторых вариантах реализации изобретения нацеленный на контрольные точки агент, например, антагонист PD-1 (на-

пример, антагонистическое анти-PD-1 антитело) или агонист OX40 (например, агонистическое анти-OX40 антитело), вводят одновременно с анти-GITR антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения нацеленный на контрольные точки агент, например, антагонист PD-1 (например, антагонистическое анти-PD-1 антитело) или агонист OX40 (например, агонистическое анти-OX40 антитело), вводят до введения анти-GITR антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения нацеленный на контрольные точки агент, например, антагонист PD-1 (например, антагонистическое анти-PD-1 антитело) или агонист OX40 (например, агонистическое анти-OX40 антитело), вводят после введения анти-GITR антитела.

Описанное в данном документе антитело можно применять в комбинации с анти-CD25 антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD25 антитело вводят одновременно с анти-GITR антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD25 антитело вводят до введения анти-GITR антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD25 антитело вводят после введения анти-GITR антитела.

В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение антагонистического анти-PD-1 антитела нуждающемуся в этом субъекту, который получал анти-GITR антитело, причем антитело к PD-1 вводят в то время, когда анти-GITR антитело повышает экспрессию PD-1 у субъекта по сравнению с экспрессией PD-1 у субъекта во время введения. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение агонистического анти-OX40 антитела нуждающемуся в этом субъекту, который получал анти-GITR антитело, причем антитело к OX40 вводят в то время, когда анти-GITR антитело повышает экспрессию OX40 у субъекта по сравнению с экспрессией OX40 у субъекта во время введения. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело индуцирует, активирует или повышает экспрессию GITR.

В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение анти-GITR антитела нуждающемуся в этом субъекту, при этом анти-GITR антитело повышает экспрессию PD-1 у субъекта по сравнению с экспрессией PD-1 у субъекта во время введения, и введение антагонистического анти-PD-1 антитела субъекту, когда происходит повышение экспрессии PD-1. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение анти-GITR антитела нуждающемуся в этом субъекту, при этом анти-GITR антитело повышает экспрессию OX40 у субъекта по сравнению с экспрессией OX40 у субъекта во время введения, и введение агонистического OX40 антитела субъекту, когда происходит повышение экспрессии OX40. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело индуцирует, активирует или повышает экспрессию GITR. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака или вирусной инфекции у субъекта, включающий этапы: (а) инкубации Т-клеток *ex vivo* с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; и (b) инфузии Т-клеток субъекту. В конкретном варианте реализации изобретения Т-клетки, которые инфузируют субъекту, являются аутологичными или аллогенными. В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки были выделены из организма субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки не инкубируют с агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело). В определенных вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает перед проведением этапа (а): (1) анализ Т-клеток в отношении экспрессии GITR на клеточной поверхности; и, (2) если этап (1) не приводит к выявлению GITR выше порогового значения, индукцию экспрессии GITR на поверхности Т-клеток путем инкубации Т-клеток с агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело). В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает инкубацию Т-клеток с агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (РТК) (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), до, одновременно или после этапа (а). В конкретном варианте реализации изобретения субъект, лечение которого проводят, является человеком. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения и/или предотвращения инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции. См. раздел 5.4.1.2, ниже, в отношении примеров инфекционных заболеваний. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения вирусной инфекции, включающий введение субъекту эффективного количества описанной в данном документе фармацевтической композиции. В определенных вариантах реализации изобретения вирусная инфекция, лечение которой проводят, вызвана вирусом папилломы человека (ВПЧ), вирусом простого герпеса или вирусом другого герпеса, вирусом гепатита В (ВГВ), вирусом гепатита С (ВГС) или вирусом другого гепатита, вирусом кори, ВИЧ или вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). В определенных вариантах реализации изобретения способ лечения вирус-

ной инфекции дополнительно включает введение субъекту противовирусного агента. В конкретном варианте реализации изобретения субъект, лечение которого проводят, является человеком.

В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ выявления анти-GITR антитела, которое способно индуцировать, активировать или повышать активность GITR в отсутствие агониста РТК, включающий приведение клетки, экспрессирующей GITR, в контакт с анти-GITR антителом в отсутствие агониста РТК и измерение активности GITR, при этом повышенная активность GITR по сравнению с активностью GITR в отсутствие анти-GITR антитела свидетельствует о том, что анти-GITR антитело способно индуцировать, активировать или повышать активность GITR в отсутствие агониста РТК. В определенных вариантах реализации изобретения активность GITR оценивают, измеряя активность NF-κB. В определенных вариантах реализации изобретения активность GITR оценивают, измеряя активацию опосредованных TRAF-адаптором сигнальных путей, при этом TRAF-адаптор выбран из группы, состоящей из TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4 и TRAF5. В определенных вариантах реализации изобретения активность GITR оценивают, измеряя активацию пути MAPK/ERK. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело повышает активность GITR по меньшей мере в два раза по сравнению с активностью GITR в отсутствие анти-GITR антитела. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело повышает активность GITR в от двух до двадцати раз по сравнению с активностью GITR в отсутствие анти-GITR антитела. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело повышает активность GITR в от двух до десяти раз по сравнению с активностью GITR в отсутствие анти-GITR антитела. В определенных вариантах реализации изобретения клетка представляет собой Т-клетку. В определенных вариантах реализации изобретения клетка не является Т-клеткой.

В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено анти-GITR антитело, которое специфически связывается с человеческим GITR, при этом указанное антитело способно индуцировать, активировать или повышать активность GITR в клетке в отсутствие инициации РТК. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено анти-GITR антитело, которое специфически связывается с человеческим GITR, при этом указанное антитело индуцирует, активирует или повышает активность NF-κB в клетке в отсутствие инициации РТК. В другом конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту анти-GITR антитела, которое специфически связывается с человеческим GITR, при этом указанное антитело способно индуцировать, активировать или повышать активность GITR и/или NF-κB в отсутствие инициации РТК.

3.1. Терминология

Термины "около" и "приблизительно", употребляемые в данном документе, чтобы модифицировать числовую величину или числовой диапазон, указывают на то, что отклонения от 5 до 10% в большую и от 5 до 10% в меньшую сторону от величины или диапазона остаются в пределах подразумеваемого значения приведенной величины или диапазона.

В контексте данного документа связывание между исследуемым антителом и первым антигеном является "существенно ослабленным" по сравнению со связыванием между исследуемым антителом и вторым антигеном, если связывание между исследуемым антителом и первым антигеном снижено по меньшей мере на 30, 40, 50, 60, 70 или 80% по сравнению со связыванием между исследуемым антителом и вторым антигеном, например, в данном эксперименте или в соответствии со средними значениями по нескольким экспериментам согласно оценке, например, методом анализа, включающим следующие этапы: (а) экспрессию на поверхности клеток (например, клеток 1624-5) первого антигена или второго антигена; (b) окрашивание клеток, экспрессирующих первый антиген или второй антиген, с использованием, например, 2 мкг/мл исследуемого антитела или поликлонального антитела в анализе проточной цитометрии и регистрацию величин средней интенсивности флуоресценции (СИФ), например, в виде среднего по более чем одному эксперименту, причем поликлональное антитело распознает как первый антиген, так и второй антиген; (с) деление величины СИФ исследуемого антитела для клеток, экспрессирующих второй антиген, на величину СИФ поликлонального антитела для клеток, экспрессирующих второй антиген (соотношение СИФ₂); (d) деление величины СИФ исследуемого антитела для клеток, экспрессирующих первый антиген, на величину СИФ поликлонального антитела для клеток, экспрессирующих первый антиген (соотношение СИФ₁); и (е) определение процента снижения связывания путем расчета $100\% \times (1 - (\text{соотношение СИФ}_1 / \text{соотношение СИФ}_2))$.

В контексте данного документа антитело не проявляет "существенного связывания" с антигеном, если при измерениях методом проточной цитометрии величина средней интенсивности флуоресценции (СИФ) антитела в отношении антигена существенно не превышает величину СИФ изотипического контрольного антитела в отношении антигена или величину СИФ в отсутствие какого-либо антитела. В контексте данного документа термины "антитело" и "антитела" являются терминами, принятыми в данной области техники, могут употребляться взаимозаменяемо в данном документе и относятся к молекуле с антигенсвязывающим участком, которая специфически связывает антиген.

Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, рекомбинантно полученные анти-

тела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие по две молекулы тяжелых цепей и легких цепей, мономер из легкой цепи антитела, мономер из тяжелой цепи антитела, димер из легких цепей антитела, димер из тяжелых цепей антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интратела, гетероконъюгаты антител, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), верблюдизированные антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')₂, дисульфид-связанные Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела) и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных антител. В определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антитела относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут принадлежать любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любому классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2) или любому подклассу (например, IgG2a или IgG2b) молекулы иммуноглобулина. В определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антитела представляют собой антитела IgG или их класс (например, человеческий IgG1 или IgG4) или подкласс. В конкретном варианте реализации изобретения антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело, предпочтительно - иммуноглобулин. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело представляет собой антитело IgG1 или IgG4.

В контексте данного документа термины "антигенсвязывающий домен", "антигенсвязывающий участок", "антигенсвязывающий фрагмент" и сходные термины относятся к части молекулы антитела, которая содержит аминокислотные остатки, которые обеспечивают специфичность молекулы антитела в отношении антигена (например, гипервариабельные участки (CDR)). Антигенсвязывающий участок может быть получен от любого вида животных, таких как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк) и люди.

В контексте данного документа термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" употребляются взаимозаменяемо и являются общепринятыми в данной области техники. Вариабельная область, как правило, относится к части антитела, в общем случае части легкой или тяжелой цепи, как правило, от около 110 до 120 аминоконцевых аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от около 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и обеспечивают связывание и специфичность конкретного антитела в отношении конкретного антигена. Вариабельность в последовательностях сконцентрирована в областях, называемых гипервариабельными участками (CDR), тогда как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Не ограничиваясь каким-либо конкретным механизмом или теорией, считается, что CDR легких и тяжелых цепей отвечают, главным образом, за взаимодействие и специфичность антитела и антигена. В определенных вариантах реализации изобретения вариабельная область представляет собой человеческую вариабельную область. В определенных вариантах реализации изобретения вариабельная область содержит CDR грызуна или мыши и каркасные области человека (FR). В конкретных вариантах реализации изобретения вариабельная область представляет собой вариабельную область примата (например, обезьяны). В определенных вариантах реализации изобретения вариабельная область содержит CDR грызуна или мыши и каркасные области примата (например, обезьяны) (FR).

Термины "VL" и "домен VL" употребляются взаимозаменяемо и относятся к вариабельной области легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" употребляются взаимозаменяемо и относятся к вариабельной области тяжелой цепи антитела.

Термин "нумерация Кабата" и схожие термины известны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части. В определенных аспектах CDR антитела можно определить в соответствии с системой нумерации Кабата (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 и Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Согласно системе нумерации Кабата CDR в пределах молекулы тяжелой цепи антитела, как правило, находятся в аминокислотных позициях от 31 до 35, которые, необязательно, могут включать одну или две дополнительные аминокислоты после 35 (называемые в соответствии со схемой нумерации Кабата 35A и 35B) (CDR1), аминокислотных позициях от 50 до 65 (CDR2) и аминокислотных позициях от 95 до 102 (CDR3). Согласно системе нумерации Кабата CDR в пределах молекулы легкой цепи антитела, как правило, находятся в аминокислотных позициях от 24 до 34 (CDR1), аминокислотных позициях от 50 до 56 (CDR2) и аминокислотных позициях от 89 до 97 (CDR3). В конкретном варианте реализации изобретения CDR описанных в данном документе антител были определены в соответствии со схемой нумерации Кабата. В контексте данного документа термины "константная область" или "константный домен" являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятые в данной области техники значения. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбокси-концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая прямо не вовлечена в связы-

вание антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина в общем случае имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с варибельным доменом иммуноглобулина.

В контексте данного документа термин "тяжелая цепь", употребляемый по отношению к антителу, может относиться к любому уникальному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константного домена, что является причиной разделения антител на классы IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

В контексте данного документа термин "легкая цепь", употребляемый по отношению к антителу, может относиться к любому уникальному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ) на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах реализации изобретения легкая цепь представляет собой человеческую легкую цепь.

"Аффинность связывания" в общем случае относится к совокупности нековалентных взаимодействий между одним связывающим участком молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте данного документа "аффинность связывания" относится к характерной аффинности связывания, которая отображает 1:1 взаимодействие между представителями пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в общем случае можно представить константой диссоциации (K_d). Аффинность можно определить и/или выразить при помощи большого числа известных в данной области техники способов, включая, но не ограничиваясь этим, равновесную константу диссоциации (K_d) и равновесную константу ассоциации (K_A). K_d рассчитывают по коэффициенту $k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$, в то время как K_A рассчитывают по коэффициенту $k_{\text{асс}}/k_{\text{дисс}}$. $k_{\text{асс}}$ относится к константе скорости ассоциации, например, антитела в отношении антигена, а $k_{\text{дисс}}$ относится к диссоциации, например, антитела в отношении антигена. $k_{\text{асс}}$ и $k_{\text{дисс}}$ можно определить при помощи методов, известных специалисту в данной области техники, таких как BIAcore® или KinExA.

В контексте данного документа "консервативная аминокислотная замена" - это замена, в которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком со сходной боковой цепью. В данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих определенный тип боковых цепей. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В определенных вариантах реализации изобретения один или более аминокислотных остатков в пределах CDR или в пределах каркасных областей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть замещены аминокислотным остатком со сходной боковой цепью.

В контексте данного документа "эпитоп" является принятым в данной области техники термином и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп) или эпитоп может, например, быть образован из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный или прерывистый эпитоп). В определенных вариантах реализации изобретения эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить методом, например, ЯМР-спектроскопии, кристаллографического исследования дифракции рентгеновских лучей, анализа ELISA, водородного/дейтериевого обмена совместно с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматомасс-спектрометрией с электрораспылением), матричного сканирующего анализа олигопептидов и/или картирования методом мутагенеза (например, картирования методом сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно проводить при помощи любых известных в данной области техники методов (например, Giegé R et al. (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Кристаллы антител: антиген можно исследовать при помощи хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей, а доводку можно осуществлять при помощи программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, поставляемого Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985), тома 114 и 115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al. (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования по картированию методом мутагенеза можно проводить при помощи любого метода, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M et al. (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989)

Science 244: 1081-1085 в отношении описания методов мутагенеза, включая методы аланин-сканирующего мутагенеза. В конкретном варианте реализации изобретения эпитоп антитела или его антигенсвязывающего фрагмента определяют при помощи исследований методом аланин-сканирующего мутагенеза, как описано в разделе 6, ниже. В контексте данного документа термины "иммуноспецифически связывает", "иммуноспецифически распознает", "специфически связывает" и "специфически распознает" являются аналогичными в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом) в том смысле, в котором это связыванием подразумевается специалистом в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами в общем случае с более низкой аффинностью согласно определению при помощи, например, иммуноанализа, BIAcore®, инструмента KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других известных в данной области техники методов анализа. В конкретном варианте реализации изобретения молекулы, которые иммуноспецифически связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая по меньшей мере на $2 \log$, $2,5 \log$, $3 \log$, $4 \log$ или более превышает K_A , когда молекулы связываются с другим антигеном.

В другом конкретном варианте реализации изобретения молекулы, которые иммуноспецифически связываются с антигеном, не проявляют перекрестную реактивность с другими белками в аналогичных условиях связывания. В другом конкретном варианте реализации изобретения молекулы, которые иммуноспецифически связываются с антигеном, не проявляют перекрестную реактивность с другими отличными от GITR белками. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое связывается с GITR с более высокой аффинностью, чем с другим, неродственным антигеном. В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое связывается с GITR (например, человеческим GITR) с аффинностью, на 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более превышающей аффинность в отношении другого, неродственного антигена согласно измерениям методом, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В конкретном варианте реализации изобретения степень связывания описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с неродственным, отличным от GITR белком составляет менее 10, 15 или 20% от связывания антитела с белком GITR согласно измерениям методом, например, радиоиммуноанализа.

В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое связывается с человеческим GITR с более высокой аффинностью, чем с другим видом GITR. В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое связывается с человеческим GITR с аффинностью, на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70% или более превышающей аффинность в отношении другого вида GITR другого вида согласно измерениям методом, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В конкретном варианте реализации изобретения связывание описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое связывается с человеческим GITR, с другим видом белка GITR составляет менее 10, 15 или 20% от связывания антитела или его фрагмента с белком человеческого GITR согласно измерениям методом, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения.

В контексте данного документа термины "глюкокортикоид-индуцированный рецептор семейства TNFR" или "GITR", или "полипептид GITR" относятся к GITR, включая, но не ограничиваясь этим, нативный GITR, изоформу GITR или межвидовой гомолог GITR. GITR представляет собой 26 кДа трансмембранный белок типа I. Номера доступа в GenBank™ BC152381 и BC152386 представляют типовые нуклеотидные последовательности человеческого GITR. Номер доступа в Swiss-Prot Q9Y5U5-1 (TNR18HUMAN; SEQ ID NO: 701) и номер доступа в GenBank™ NP_004186 представляют типовые аминокислотные последовательности человеческого GITR для изоформы 1. Длина этой аминокислотной последовательности составляет 241 аминокислоту, при этом первые 25 аминокислотных остатков кодируют сигнальную последовательность. Изоформа 1 представляет собой мембранный белок типа I. Типовая зрелая аминокислотная последовательность человеческого GITR представлена в виде SEQ ID NO: 700. В противоположность этому изоформа 2 представляет собой секретируемую форму человеческого GITR, а ее длина составляет приблизительно 255 аминокислот.

Номер доступа в Swiss-Prot Q9Y5U5-2 и номер доступа в GenBank™ NP683699 представляют типовые аминокислотные последовательности человеческого GITR для изоформы 2. Длина изоформы 3 человеческого GITR составляет приблизительно 234 аминокислоты. Номер доступа в Swiss-Prot Q9Y5U5-3 и номер доступа в GenBank™ NP_683700 (предшественник изоформы 3) представляют типовые аминокислотные последовательности человеческого GITR для изоформы 3. В конкретном варианте реализации изобретения GITR является человеческим GITR. В другом конкретном варианте реализации изобретения GITR представляет собой изоформу 1 человеческого GITR (SEQ ID NO: 701). В определенных вариантах реализации изобретения GITR представляет собой человеческую изоформу 2 (SEQ ID NO: 702) или человеческую изоформу 3 (SEQ ID NO: 703). GITR также известен как представитель суперсемейства ре-

цепторов факторов некроза опухолей 18 (TNFRSF18), активационно-индуцибельный рецептор семейства TNFR (AITR), GITR-D и CD357. Человеческий GITR обозначен как GeneID: 8784 в Entrez Gene.

Аминокислотная последовательность незрелой формы типового белка GITR яванского макака представлена в SEQ ID NO: 704. Зрелая форма этого типового белка соответствует аминокислотами 26-234 в SEQ ID NO: 704.

В контексте данного документа термины "лиганд GITR" и "GITRL" относятся к лиганду глюкокортикоид-индуцируемого TNFR-подобного белка. GITRL также известен как активационно-индуцированный ФНО-подобный лиганд (AITRL) и представитель суперсемейства лигандов факторов некроза опухолей 18 (ФНО-SF18). Номер доступа в GenBank™ AF125303 представляет типовую нуклеотидную последовательность человеческого GITRL. Номер доступа в GenBank™ NP_005083 и номер доступа в Swiss-Prot Q9UNG2 представляют типовые аминокислотные последовательности человеческого GITRL. В конкретном варианте реализации изобретения GITRL представляет собой человеческий GITRL с SEQ ID NO: 716.

В контексте данного документа термин "клетка-хозяин" может представлять клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В конкретных вариантах реализации изобретения термин "клетка-хозяин" относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомство или потенциальное потомство такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, вследствие мутаций или влияния окружающей среды, которые могут возникать в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

В контексте данного документа термин "эффективное количество" в контексте применения терапии к субъекту относится к количеству терапии, при котором достигается желаемый профилактический или терапевтический эффект. Примеры эффективного количества приведены в разделе 5.4.1.3, ниже.

В контексте данного документа термины "субъект" и "пациент" употребляются взаимозаменяемо. Субъект может быть животным. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект является млекопитающим, таким как не-примат (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса и т.д.) или примат (например, обезьяна или человек), наиболее предпочтительно - человеком. В определенных вариантах реализации изобретения эти термины относятся к отличному от человека животному (например, отличному от человека животному, такому как свинья, лошадь, корова, кошка или собака). В некоторых вариантах реализации изобретения эти термины относятся к домашнему или сельскохозяйственному животному. В конкретных вариантах реализации изобретения эти термины относятся к человеку.

4. Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен вестерн-блоттинг в невосстанавливающих условиях, иллюстрирующий специфичность анти-GITR антитела 231-32-15 по сравнению с изотипическим контролем. Блоттинг антитела проводят против человеческого рекомбинантного белка GITR (рекомб. белок Hu GITR), мышинового рекомбинантного белка GITR (рекомб. белок Mu GITR), клеток CMS5A, экспрессирующих рекомбинантный человеческий GITR (CMS5A-huGITR), клеток CMS5A дикого типа (CMS5A-дт), белка из активированных клеток CD4⁺ (активированные CD4⁺) и белка из необработанных клеток CD4⁺ (необработанные CD4⁺). Реактивность 231-32-15 наблюдается против человеческого GITR, рекомбинантного человеческого GITR в клетках CMS5A и естественного человеческого GITR в активированных клетках CD4⁺.

Фиг. 2А и 2В иллюстрируют анализ FACS конкурентного связывания анти-GITR антител против коммерческого (R&D Systems) анти-GITR mAb. На фиг. 2А блокирование R&D Systems mAb исследуют, используя R&D mAb и исследуемые антитела (антитело 1042-7, антитело 1039-45, антитело 1333-21 и антитело 32-15), как указано на фигуре. Условие "без антитела" иллюстрирует связывание одного R&D Systems mAb в отсутствие исследуемых антител. Фиг. 2В иллюстрирует блокирование анти-GITR антитела 231-1039-45 без mAb, с использованием R&D Systems mAb и исследуемых антител (антитела 1042-7, антитела 1039-45, антитела 1333-21 и антитела 32-14), как указано на фигуре. Условие "без антитела" иллюстрирует связывание одного антитела 231-1039-45 в отсутствие исследуемых антител.

Фиг. 3А, 3В и 3С. Фиг. 3А иллюстрирует окрашивание CMS5A-GITR антителами 1333-21 партии 1, 1333-21 партии 2 и антителом R&D при разных концентрациях антител. На фиг. 3В приведены графики интенсивности флуоресценции ex vivo МКИК клеток CD3-CD19-GITR⁺ и CD4⁺CD25-GITR⁺ после окрашивания антителами 1042-7, 32-15, 1039-45, 1333-21 и антителом R&D. На фиг. 3С приведен анализ FACS для клеток CD3-CD19-GITR⁺ и CD4⁺CD25-GITR⁺ с антителом 1333-21 и антителом R&D Systems.

Фиг. 4 иллюстрирует оценку костимулирующего действия анти-GITR антитела на Т-клетки CD4⁺ в комбинации с разными концентрациями анти-CD3 (ОКТ3) антитела. На верхней панели приведен график % клеток с низким содержанием CFSE для каждого исследуемого антитела (PBS-контроль, R&D, 1042-7, 32-15, 1039-45 и 1333-21) в комбинации с уменьшающимися концентрациями антитела ОКТ3 (5, 1, 0,2, 0,04 и 0 мкг/мл). На нижней панели приведен график концентрации ИФН γ (пг/мл) для каждого исследуемого антитела (PBS-контроль, R&D, 1042-7, 32-15, 1039-45 и 1333-21) в комбинации с уменьшающимися концентрациями антитела ОКТ3 (5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,04 мкг/мл и 0 мкг/мл).

Фиг. 5 иллюстрирует связывание GITRL-PE с GITR в присутствии анти-GITR антител - химерного родительского 231-32-15 и m6C8. Дополнительное антитело SK48E26, которое распознает ИЛ-1 β , использовали в качестве отрицательного контроля. Процент связывания GITRL-PE определяли при помощи суспензионной матричной технологии (система Luminex® 200) в присутствии увеличивающихся концентраций антител (12, 37, 111, 333, 1000, 3000 и 9000 нг/мл). Фиг. 5 иллюстрирует результаты по четырем независимым повторам этого анализа, проводимого в двух повторностях, а стандартное отклонение определяли для n=8.

Фиг. 6 представляет аналогичный приведенному на фиг. 5 график, на котором процент связывания GITRL-PE определяли при помощи суспензионной матричной технологии (система Luminex® 200) в присутствии увеличивающихся концентраций антител (12, 37, 111, 333, 1000, 3000 и 9000 нг/мл). Исследуемые анти-GITR антитела представляли химерное родительское антитело 231-32-15 и два гуманизированных варианта Hum231#1 и Hum231#2. Эта фигура иллюстрирует результаты по одному эксперименту, проводимому в двух повторностях. Фиг. 7 иллюстрирует связывание лиганда GITR с GITR в присутствии mAb согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore® T100/200). Исследуемые анти-GITR антитела представляли химерное родительское антитело 231-32-15, гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum231#2 и m6C8. Отрицательным контролем служило анти-ИЛ-1 β антитело SK48E26.

На фиг. 8А и 8В приведены графики FACS по результатам анализа субоптимальной стимуляции CD3 для оценки действия стимуляции анти-GITR антителами на обогащенные Т-клетки CD4⁺ из двух разных лейкоцитарных пленок. Фиг. 8А иллюстрирует FACS-анализ количества клеток и пролиферации Т-клеток CD4 из группы с сильным ответом на стимуляцию (лейкоцитарная пленка 6), а фиг. 8В иллюстрирует FACS-анализ для группы с низким ответом (лейкоцитарная пленка 8). Пролиферация клеток (CFSE; ось x) приведена для 10 мкг/мл анти-GITR антитела (химерное родительское антитело 231-32-15 и гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum231#2). Контролем служили одно анти-CD3/анти-CD28 антитело или отсутствие стимуляции. Анализ проводили в трех повторностях.

Фиг. 9А и 9В представляют собой гистограммы, иллюстрирующие действие анти-GITR гуманизированных вариантных антител Hum231#1 и Hum231#2 на клеточную пролиферацию обогащенных Т-клеток CD4 (фиг. 9А) и число клеток (фиг. 9В) по сравнению с антителом m6C8 в анализе субоптимальной стимуляции CD3. Антитела применяли в концентрации 10 мкг/мл. Последняя колонка (залитая черным; фиг. 9А и 9В) иллюстрирует стимуляцию анти-CD3/анти-CD28 без добавления каких-либо анти-GITR антител.

Фиг. 10А, 10В, 10С и 10D иллюстрируют анализ выработки цитокинов ИФН γ , ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО α , соответственно, индуцируемый введением анти-GITR антител, в анализе субоптимальной стимуляции CD3. Исследуемые анти-GITR антитела представляли химерное родительское 231-32-15 и гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum231#2 в концентрациях 10 мкг/мл и 5 мкг/мл.

Фиг. 11 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую дополнительное титрование анти-GITR антител и их действие на клеточную пролиферацию в анализе субоптимальной стимуляции CD3. Химерное родительское антитело 231-32-15 и гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum231#2 применяли в концентрациях 10 мкг/мл, 5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл.

Фиг. 12А и 12В иллюстрируют дополнительное титрование анти-GITR антител и их действие на выработку ИФН γ в анализе субоптимальной стимуляции CD3. Химерное родительское антитело 231-32-15 и гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum231#2 применяли в концентрациях 10 мкг/мл, 5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл в виде связанных с планшетом антител (фиг. 12А) или 20 мкг/мл, 10 мкг/мл и 5 мкг/мл в виде растворимых антител (фиг. 12В).

На фиг. 13 представлен набор столбчатых графиков, иллюстрирующих результаты костимуляции 5 мкг/мл связанного с планшетом Hum231#2 на секрецию цитокинов МКПК в анализе субоптимальной стимуляции CD3. Данные, приведенные на фиг. 13, получены по двум донорам, исследуемым на 2 день и 4 день после стимуляции. Максимальную кратность увеличения индукции по сравнению с изотипическим контролем наносили на график для шести разных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α , ИЛ-10, ИЛ-13 и ИЛ-4). Усы представляют стандартное отклонение по двум репликам для каждого цитокина. Каждого донора исследовали по меньшей мере в трех независимых экспериментах.

На фиг. 14А, 14В и 14С представлены результаты анализа внутриклеточного анализа цитокинов, отображающие выработку ИФН γ и ФНО α , индуцируемую связанным с планшетом Hum231#2, Hum231#2w или rab1989 (IgG4-аналог Hum231#2w) при субоптимальной стимуляции CD3. На фиг. 14А представлена группа графиков по проточной цитометрии, иллюстрирующих совместное окрашивание ИФН γ и ФНО α для Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺. Процент ИФН γ ⁺ монофункциональных Т-клеток, ФНО α ⁺ монофункциональных Т-клеток или ИФН γ ⁺ ФНО α ⁺ полифункциональных Т-клеток наносили на график для Hum231#2, Hum231#2w, rab1989 или изотипического контроля в диапазоне субоптимальных концентраций анти-CD3 антитела (фиг. 14В и 14С). Каждая точка на фиг. 14В и 14С представляет двойную реплику для исследуемого условия. Усами представлено стандартное отклонение. Анти-GITR антитела применяли в концентрации 5 мкг/мл. Графики являются репрезентативными по экспериментам с приме-

нением МКПК от двух (фиг. 14А и 14В) и четырех (фиг. 14С) разных доноров соответственно.

На фиг. 15А, 15В и 15С приведены группы столбчатых графиков, иллюстрирующих результаты экспериментов по сравнению анти-GITR антитела Hum231#2 в разных условиях перекрестного связывания. Фиг. 15А представляет столбчатый график, иллюстрирующий максимальную кратность увеличения индукции по сравнению с изотипическим контролем для процента ИФН γ + ФНО α + полифункциональных Т-клеток CD8+ с использованием МКПК, которые костимулировали 5 мкг/мл связанного с планшетом (СП) или растворимого Hum231#2 или изотипического контроля. Усами представлено стандартное отклонение. * представляет $p < 0,05$, а ** представляет $p < 0,005$ (непарный Т-критерий). На фиг. 15В и 15С на график наносили максимальную кратность повышения индукции по сравнению с изотипическим контролем для шести разных цитокинов для связанного с планшетом Hum231#2 (фиг. 15В) или анти-Fc перекрестно связанного Hum231#2 (фиг. 15С).

Усами представлено стандартное отклонение для двойной реплики для каждого цитокина.

Фиг. 16А и 16В иллюстрируют результаты стимуляции анти-CD3/анти-CD28 и анти-GITR антителом на эффекторные (T-eff) и регуляторные Т-клетки (Treg). На фиг. 16А показано, что активированные Т-эффекторные и Т-регуляторные клетки экспрессируют GITR на своей поверхности после стимуляции одним анти-CD3/анти-CD28 или в сочетании с анти-GITR антителами. При этом, как показано на фиг. 16В, костимуляция анти-GITR антителами приводит к преимущественной экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками. Клеточная экспансия/пролиферация (CFSE; ось у) проиллюстрирована для 10 мкг/мл анти-GITR антител (химерное родительское антитело 231-32-15 и гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum231#2) на лейкоцитарной пленке 8. Контролями служили одно анти-CD3/анти-CD28 антитело при 125 нг/мл или отсутствие стимуляции.

Фиг. 17А и 17В иллюстрируют результаты для пролиферации Т-клеток, индуцированной исследуемыми анти-GITR антителами. Фиг. 17А иллюстрирует пролиферацию клеток CD4, а фиг. 17В иллюстрирует пролиферацию клеток CD8 в общем количестве МКПК, которые стимулировали 31,25 нг/мл анти-CD3 антитела. Химерное родительское антитело 231-32-15 и гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum231#2 исследовали при концентрации 10 мкг/мл.

На фиг. 18А, 18В и 18С представлены графики, иллюстрирующие результаты репортерного анализа GITR NF- κ B-люциферазы в отсутствие или присутствии 0,3 мкг/мл связанного с планшетом анти-CD3 антитела (клон SP34). На фиг. 18А представлен график, на котором приведены относительные световые единицы (ОСЕ) люциферазы в некотором диапазоне концентраций анти-GITR антитела через 18 ч после стимуляции в присутствии анти-CD3 антитела. На фиг. 18В представлен график, на котором приведены ОСЕ люциферазы при разных концентрациях анти-GITR антитела через 5 ч после стимуляции в отсутствие анти-CD3 антитела. На фиг. 18С представлен график, на котором приведены наибольшие показатели экспрессии люциферазы (GITR Ab/изотипический контроль) через 0, 2, 5, 6, 8 и 18 ч после стимуляции. Усами представлено стандартное отклонение по двум репликам. Исследуемыми анти-GITR антителами были Hum231#2w и m6C8. Приведенные данные являются репрезентативными по четырем экспериментам с анти-CD3 антителом или двум экспериментам без анти-CD3 антитела.

На фиг. 19А представлен столбчатый график, иллюстрирующий нормированную плотность рецепторов человеческого GITR на активированных nTreg, Т-клетках CD4+ или Т-клетках CD8+ согласно данным проточной цитометрии.

Применяемым анти-GITR антителом было РЕ-конъюгированное мышинное античеловеческое антитело к GITR (Biolegend: 621; 311604/B171072). Усами представлено стандартное отклонение.

На фиг. 19В представлен график, иллюстрирующий исследование анти-GITR антитела Hum231#2w с применением репортерной линии клеток Fc-гамма-рецептора IIIA (CD16). Репортерные клетки Jurkat NFAT-люцифераза, сверхэкспрессирующие CD16A с высокоаффинным полиморфизмом 158 V/V, культивировали вместе с активированными первичными nTreg и эффекторными Т-клетками в течение 20 ч при 37°C в присутствии Hum231#2w или изотипического контроля. Через 20 ч регистрировали относительные световые единицы (ОСЕ), представляющие связывание CD16A. Δ ОСЕ представляет ОСЕ анти-GITR антитела минус ОСЕ изотипического контроля. Усами представлено стандартное отклонение ($n=2$). Приведенные данные являются репрезентативными по экспериментам с клетками от трех доноров. На фиг. 19С представлена группа гистограмм, иллюстрирующих поверхностную экспрессию GITR, определенную методом проточной цитометрии. Образцы получали из крови здоровых человеческих доноров (а-с, $n=3$) или из опухолевых тканей пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ) (d-f, $n=3$). Клеточные популяции были определены как: Tconv (CD3+, CD4+, CD8a-, CD25low, FOXP3-) или Treg (CD3+, CD4+, CD8a-, CD25high, FOXP3+).

Фиг. 20А, 20В и 20С иллюстрируют результаты экспериментов с использованием МКПК африканской зеленой мартышки (АЗМ). На фиг. 20А представлена группа графиков по результатам проточной цитометрии для окрашивания активированных Т-клеток CD4+ и CD8+ африканской зеленой мартышки (АЗМ) с использованием анти-GITR антитела Hum231#2 и анти-PD-1 антитела. МКПК здоровых АЗМ активировали анти-CD3 антителом (клон SP34.2) или ConA plus ИЛ-2 (20 Е/мл) в течение 3 дней. Графики по результатам проточной цитометрии являются репрезентативными по экспериментам, в которых

использовали МКПК от трех разных АЗМ. Фиг. 20В и 20С представляют результаты анализа субстимуляции CD3 с использованием МКПК АЗМ. На фиг. 20В представлена пара графиков по результатам проточной цитометрии, иллюстрирующих совместное окрашивание CD8 и ИФН γ для клеток, которые костимулировали Hum231#2w или изотипическим контролем. На фиг. 20С процент ИФН γ + Т-клеток CD8+ АЗМ наносят на график для разных концентраций анти-GITR антитела. Каждая точка представляет реплику по двум лункам, а усами представлено стандартное отклонение. Данные, приведенные на фиг. 20В и 20С, являются репрезентативными по экспериментам с МКПК от двух АЗМ.

Фиг. 21А и 21В иллюстрируют результаты окрашивания поверхностных OX40 и PD-1 на Т-клетках CD4+ и CD8+, которые стимулировали 0,8 мкг/мл связанного с планшетом анти-CD3 антитела и 5 мкг/мл анти-GITR антитела Hum231#2. На фиг. 21А представлена группа графиков по результатам проточной цитометрии и гистограммы, иллюстрирующие совместное окрашивание OX40 и PD-1. На фиг. 21В каждый столбик представляет величину СИФ для PD-1 и OX40 на Т-клетках CD4+ и CD8+, которые стимулировали Hum231#2 (черные столбики), изотипическим контролем (серые столбики) или только средой (белые столбики). Усами представлено стандартное отклонение. Графики по результатам проточной цитометрии являются репрезентативными по экспериментам с МКПК от одного донора.

Фиг. 22А и 22В иллюстрируют дизайн библиотек мутаций для генерации вариантов антител с модификациями на уровне зародышевой линии. Разные позиции каркасной области и CDR, включенные в библиотеку на основании человеческой зародышевой линии IGHV1-2*02 VH, показаны на фиг. 22А (SEQ ID NO: 37-53, соответственно, в порядке появления), а для библиотеки на основании человеческой зародышевой линии IGKV4-1*01 VL - на фиг. 22В (SEQ ID NO: 54-71, соответственно, в порядке появления).

Фиг. 23 представляет собой таблицу, в которой перечислены 17 вариантов антител с модификациями на уровне зародышевой линии и уточнены вариабельные области их тяжелой и легкой цепей с соответствующими номерами SEQ ID. В таблице приведены количество дополнительных аминокислот зародышевой линии и средняя относительная аффинность вариантных антител по сравнению с химерным родительским антителом 231-32-15.

Фиг. 24А-С представляют собой таблицы, в которых перечислены 107 вариантов антител с модификациями на уровне зародышевой линии и уточнены вариабельные области их тяжелой и легкой цепей с соответствующими номерами SEQ ID.

Фиг. 25А и 25В иллюстрируют связывание GITRL-PE и GITR в присутствии набора вариантов анти-GITR антител с модификациями на уровне зародышевой линии. Процент связывания GITRL-PE определяли при помощи суспензионной матричной технологии (система Luminex® 200) в присутствии увеличивающихся концентраций антител (12, 37, 111, 333, 1000, 3000 и 9000 нг/мл).

Фиг. 26А и 26В иллюстрируют действие вариантов антител с модификациями на уровне зародышевой линии на клеточную пролиферацию (низкий % CFSE) по сравнению с химерным родительским антителом 231-32-15 и гуманизированными вариантами Hum231#1 и Hum231#2 для обогащенных Т-клеток CD4 из двух лейкоцитарных пленок, BC4 (фиг. 26А) и BC9 (фиг. 26В). Анализ субоптимальной стимуляции CD3 проводили, используя связанное с планшетом анти-CD3 антитело при 125 нг/мл со связанным с планшетом или растворимым изотипическим контролем. Анти-GITR антитела применяли в концентрации 10 мкг/мл.

Фиг. 27А и 27В иллюстрируют действие вариантов антител с модификациями на уровне зародышевой линии на высвобождение цитокинов ИФН γ и ИЛ-10, соответственно, по сравнению с химерным родительским антителом 231-32-15 и гуманизированными вариантами Hum231#1 и Hum231#2 для обогащенных Т-клеток CD4 из лейкоцитарной пленки BC4. Анализ субоптимальной стимуляции CD3 проводили, используя связанное с планшетом анти-CD3 антитело при 125 нг/мл со связанным с планшетом или растворимым изотипическим контролем. Анти-GITR антитела применяли в концентрации 10 мкг/мл, а уровни цитокинов измеряли в культуральном супернатанте.

Фиг. 28А и 28В иллюстрируют действие вариантов антител с модификациями на уровне зародышевой линии на высвобождение цитокинов ИФН γ и ИЛ-10, соответственно, по сравнению с химерным родительским антителом 231-32-15 и гуманизированными вариантами Hum231#1 и Hum231#2 для обогащенных Т-клеток CD4 из лейкоцитарной пленки BC9. Анализ субоптимальной стимуляции CD3 проводили, используя связанное с планшетом анти-CD3 антитело при 125 нг/мл со связанным с планшетом или растворимым изотипическим контролем. Анти-GITR антитела применяли в концентрации 10 мкг/мл, а уровни цитокинов измеряли в культуральном супернатанте.

Фиг. 29А и 29В иллюстрируют процент ИФН γ -положительных Т-клеток CD4+ (определяемый методом внутриклеточного окрашивания) вариантов антител с модификациями на уровне зародышевой линии по сравнению с химерным родительским антителом 231-32-15 и гуманизированными вариантами Hum231#1 и Hum231#2 для обогащенных Т-клеток CD4 из двух лейкоцитарных пленок. Фиг. 29А иллюстрирует результаты для лейкоцитарной пленки 13 (BC13), и фиг. 29В иллюстрирует результаты для лейкоцитарной пленки 18 (BC18).

На фиг. 30А-С представлена группа графиков, иллюстрирующих результаты репортерного анализа

GITR NF-κB-люциферазы в присутствии 0,3 мкг/мл анти-CD3 антитела. Исследуемыми в этом анализе анти-GITR антителами были Hum231#2w и 20 вариантов зародышевой линии: pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, pab2159, pab2160 и pab2161. На фиг. 30A-C представлен график ОСЕ люциферазы через 18 ч после стимуляции для разных исследуемых концентраций анти-GITR антитела. Усами представлено стандартное отклонение. На фиг. 30D-F представлена группа графиков, иллюстрирующих результаты репортерного анализа GITR NF-κB-люциферазы в отсутствие анти-CD3 антитела. Исследуемыми в этом анализе анти-GITR антителами были m6C8, Hum231#2w и 20 вариантов зародышевой линии: pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, pab2159, pab2160 и pab2161. На фиг. 30D-F представлен график ОСЕ люциферазы через 6 ч после стимуляции для разных исследуемых концентраций анти-GITR антител. Усами представлено стандартное отклонение. Графики являются репрезентативными для данных по двум экспериментам (фиг. 30A-C) или одному эксперименту (фиг. 30D-F).

Фиг. 31 иллюстрирует снижение связывания пре-B-клеток 1624-5, экспрессирующих химерное родительское антитело 231-32-15, с биотинилированным GITR (GITR-bio), когда GITR-bio предварительно инкубировали с химерным родительским антителом 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2. Профиль справа на фиг. 31 иллюстрирует связывание пре-B-клеток 1624-5, экспрессирующих химерное родительское антитело 231-32-15, с GITR-bio. При этом на профиле справа отражено снижение связывания клеток 1624-5, экспрессирующих химерное родительское антитело 231-32-15, с GITR-bio после предварительной инкубации GITR-bio с любым из химерного родительского антитела 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2.

Фиг. 32 иллюстрирует результаты анализа конкуренции за эпитоп, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore® T100/200). Антиген GITR иммобилизовали на сенсорном чипе CM5, а анти-GITR антитела применяли в концентрации 300 нМ. Первым применяли химерное родительское антитело 231-32-15, а после него применяли мышинное антитело 6C8.

Фиг. 33A и 33B иллюстрируют результаты эксперимента по картированию эпитопов с применением клеточной библиотеки, экспрессирующей варианты GITR, полученной методом ПЦР с внесением ошибок. На фиг. 33A и 33B приведено выравнивание последовательностей вариантов GITR, которые связываются с поликлональным анти-GITR антителом, но не связываются с анти-GITR химерным родительским антителом 231-32-15.

Фиг. 34A и B иллюстрируют результаты эксперимента по картированию эпитопов с применением аланинового сканирования. Следующие позиции в человеческом GITR (пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 701) отдельно мутировали на аланин: P28A, T29A, G30A, G31A, P32A, T54A, T55A, R56A, C57A, C58A, R59A, D60A, Y61A, P62A, G63A, E64A, E65A, C66A, C67A, S68A, E69A, W70A, D71A, C72A, M73A, C74A, V75A и Q76A. Исследуемые в этом эксперименте антитела, приведенные на фиг. 34A, включали: моноклональные анти-GITR антитела Hum231#2, три варианта зародышевой линии (pab1967, pab1975 и pab1979) и антитело m6C8; и поликлональное анти-GITR антитело (AF689, R&D systems). На фиг. 34A приведена таблица с обобщенными результатами связывания Hum231#2, трех вариантов зародышевой линии (pab1967, pab1975 и pab1979) и стандартного антитела m6C8 с клетками 1624-5, экспрессирующими аланиновыми мутантами человеческого GITR. На фиг. 34B представлена группа графиков по результатам проточной цитометрии, иллюстрирующих окрашивание клеток 1624-5, экспрессирующих человеческий GITR дикого типа, мутанта D60A или мутанта G63A с использованием моноклональных антител 231-32-15, Hum231#2 или m6C8 или поликлонального антитела. Процент GITR-положительных клеток указан на каждом графике.

На фиг. 35A приведено выравнивание последовательностей человеческого GITR, V1M GITR яванского макака и V1M/Q62P/S63G GITR яванского макака с выделенными позициями 62 и 63, в которых две аминокислоты из GITR (GlnSer) яванского макака были замещены соответствующими остатками в человеческом GITR (ProGly).

На фиг. 35B представлена группа графиков по результатам проточной цитометрии, иллюстрирующих окрашивание клеток 1624-5, экспрессирующих человеческий GITR, V1M GITR яванского макака или V1M/Q62P/S63G GITR яванского макака с использованием моноклональных антител 231-32-15, Hum231#2 или m6C8 или поликлонального анти-GITR антитела.

5. Подробное описание изобретения

В данном документе предложены антитела (например, моноклональные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR) и модулируют активность GITR. Например, в одном аспекте в данном документе предложено(ы) антитело(а) или его(их) фрагмент(ы), которое специфически связывается с GITR и усиливает, индуцирует или повышает один или более видов активности GITR. В конкретном варианте реализации изобретения антитело(а) или его(их) антигенсвязывающий(е) фрагмент(ы) является выделенным. Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), такие как комплементарная ДНК (кДНК), кодирую-

щие такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Дополнительно предложены векторы (например, экспрессионные векторы) и клетки (например, клетки-хозяева), содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Также предложены способы получения таких антител. В других аспектах в данном документе предложены способы и применения для индукции, повышения или усиления активности GITR и лечения определенных патологических состояний, таких как рак и инфекционные заболевания. Также предложены связанные композиции (например, фармацевтические композиции), наборы и способы выявления.

5.1. Антитела

В конкретном аспекте в данном документе предложены антитела (например, моноклональные антитела, такие как химерные или гуманизированные антитела) и их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR). В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент частично ингибирует связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GITR (например, человеческим GITR). В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GITR (например, человеческим GITR) менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GITR (например, человеческим GITR) менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% согласно оценке методом, описанным в примере 2, ниже (например, разделы 6.2.5.2 или 6.2.5.4, ниже). В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 333, 300, 250, 200, 100, 50 или 10 нг/мл ингибирует связывание 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL (например, GITRL-PE) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Lumindex®) в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% по сравнению со связыванием 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Lumindex® 200). В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации от 1000 до 750 нг/мл, от 1000 до 500 нг/мл, от 850 до 500 нг/мл, от 750 до 500 нг/мл, от 600 до 500 нг/мл, от 500 до 400 нг/мл, от 400 до 300 нг/мл или от 300 до 200 нг/мл ингибирует связывание 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL (например, GITRL-PE) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Lumindex®) в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20% или 10% по сравнению со связыванием 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Lumindex® 200). В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 1000 нг/мл ингибирует менее чем 80% (в некоторых вариантах реализации изобретения от 40 до 70%, от 50 до 80% или от 40 до 80%) связывания 0,5 нМ меченого GITRL (например, человеческого GITRL) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Lumindex®) в концентрации 5 пг/мл/гранулу по сравнению со связыванием 0,5 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе.

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 3500, 3400, 3300, 3200, 3100, 3000, 2900, 2800, 2700, 2600, 2500, 2400, 2300, 2200, 2100, 2000, 1900, 1800, 1700, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200 или 1100 нг/мл ингибирует связывание 1,5 нМ, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL (например, GITRL-PE) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Lumindex®) в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% по сравнению со связыванием 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Lumindex® 200). В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации от 3500 до 3200 нг/мл, от 3500 до 3000 нг/мл, от 3200 до 2500 нг/мл, от 3000 до 2200 нг/мл, от 2500 до 1800 нг/мл, от 2000 до 1500 нг/мл, от 1700 до 1200 нг/мл или от 1500 до 1000 нг/мл ингибирует связывание 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1

В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75% GITRL (например, человеческого GITRL) связывается с G1TR (например, человеческим G1TR) в присутствии описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе. В конкретном варианте реализации изобретения по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75% GITRL (например, человеческого GITRL) связывается с G1TR (например, человеческим G1TR) в присутствии описанного в данном документе антитела или его антиген-

анализе (например, система Luminex® 200). В определенном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 37 нг/мл не ингибирует связывание 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) с G1TR (например, человеческим G1TR) более чем на 60%, когда G1TR (например, человеческий G1TR) связан с гранулами (например, гранулами Luminex®) в концентрации 5 пг/мл на гранулу, по сравнению со связыванием 0,5 нМ меченого GITRL с G1TR, связанным с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу, в отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Luminex® 200). В определенном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 12 нг/мл не ингибирует связывание 0,5 нМ GITRL (например, человеческого GITRL) с G1TR (например, человеческим G1TR) более чем на 80%, когда G1TR (например, человеческий G1TR) связан с гранулами (например, гранулами Luminex®) в концентрации 5 пг/мл на гранулу, по сравнению со связыванием 0,5 нМ меченого GITRL с G1TR, связанным с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу, в отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Luminex® 200).

В другом варианте реализации изобретения определенное количество меченого GITRL (например, человеческого GITRL-PE) связывается с G1TR, связанным с гранулами (например, человеческим G1TR, связанным с гранулами Luminex®), в присутствии описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в способе, включающем: (а) связывание G1TR (например, человеческого G1TR) с гранулами в концентрации приблизительно 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу; (б) инкубацию в лунке G1TR, связанного с гранулами в концентрации приблизительно 30, 40 или 50 гранул/мкл, с 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 или 10 нг/мл описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в течение первого периода времени (например, 30, 60 мин, 1,5 ч, 2, 2,5 или 3 ч); (с) добавление в лунку меченого GITRL (например, человеческого GITRL-PE) для получения конечной концентрации, составляющей приблизительно 1,5, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL и приблизительно 15 гранул/мкл, 20 гранул/мкл или 25 гранул/мкл, и инкубацию в течение второго периода времени (например, 30 мин, 1 ч, 1,5, 2, 2,5 или 3 ч); и (d) выявление меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, например, в суспензионном матричном анализе, таком как система Luminex® 200. В конкретных вариантах реализации изобретения количество меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, в присутствии анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента определяют относительно количества меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, в отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах реализации изобретения отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает, что в лунке не присутствует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В других вариантах реализации изобретения отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает, что в лунке присутствует изотипическое контрольное антитело, которое не связывается с G1TR. В соответствии с этими вариантами реализации изобретения определенное количество меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, в присутствии анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет в некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, или от 15 до 60%, от 20 до 60%, от 30 до 70% или от 20 до 50% от количества меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, в отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В другом варианте реализации изобретения определенное количество меченого GITRL (например, человеческого GITRL-PE) связывается с G1TR, связанным с гранулами (например, человеческим G1TR, связанным с гранулами Luminex®), в присутствии описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в способе, включающем: (а) связывание G1TR (например, человеческого G1TR) с гранулами в концентрации приблизительно 5 пг/мл на гранулу; (б) инкубацию в лунке G1TR, связанного с гранулами в концентрации приблизительно 40 гранул/мкл, с 3000 нг/мл, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 50 или 10 нг/мл описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в течение первого периода времени (например, 30, 60 мин, 1,5 ч, 2, 2,5 или 3 ч); (с) добавление в лунку меченого GITRL (например, человеческого GITRL-PE) для получения конечной концентрации, составляющей 0,5 нМ меченого GITRL и приблизительно 20 гранул/мкл, и инкубацию в течение второго периода времени (например, 30 мин, 1 ч, 1,5, 2, 2,5 или 3 ч); и (d) выявление меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, например, в суспензионном матричном анализе, таком как система Luminex® 200. В конкретных вариантах реализации изобретения количество меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, в присутствии анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента определяют относительно количества меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами G1TR, в отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах реализации изобретения отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает, что в лунке не присутствует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В других вариантах реализации изобретения отсутствие анти-G1TR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает, что в

лунке присутствует изотипическое контрольное антитело, которое не связывается с GITR. В соответствии с этими вариантами реализации изобретения определенное количество меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами GITR, в присутствии анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет в некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, или от 20 до 70%, от 20 до 60%, от 30 до 70% или от 20 до 50% от количества меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами GITR, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105 или 100 нМ, связанное с GITR (например, человеческим GITR), иммобилизованным на чипе (например, сенсорном чипе CM5), ингибирует связывание 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105 или 100 нМ GITRL (например, нековалентно связанного тримера человеческого GITRL) с GITR, иммобилизованным на чипе, менее чем на 60%, менее чем на 55%, менее чем на 50%, менее чем на 45%, менее чем на 40%, менее чем на 35%, менее чем на 30%, менее чем на 25%, менее чем на 20% или менее чем на 15%. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации 125 нМ, связанное с GITR (например, человеческим GITR), иммобилизованным на чипе (например, сенсорном чипе CM5), ингибирует связывание 125 нМ GITRL (например, нековалентно связанного тримера человеческого GITRL) с GITR, иммобилизованным на чипе, менее чем на 60%, менее чем на 55%, менее чем на 50%, менее чем на 45%, менее чем на 40%, менее чем на 35%, менее чем на 30%, менее чем на 25%, менее чем на 20% или менее чем на 15%.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент связывается с GITR (например, человеческим GITR) с константой скорости диссоциации ($k_{\text{дисс}}$), составляющей $8,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, $3,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, $2,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, $8,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, $3,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, $8,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или менее, $3,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или менее, $2,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или менее, $8,5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ или менее, $3,5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ или менее, $2,5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ или менее, $8,5 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$ или менее, $2,5 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$ или менее, $8,5 \times 10^{-8} \text{ с}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-8} \text{ с}^{-1}$ или менее, $2,5 \times 10^{-8} \text{ с}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-8} \text{ с}^{-1}$ или менее, $8,5 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ или менее, $2,5 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ или менее или $1 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ или менее. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент связывается с GITR (например, человеческим GITR) с $k_{\text{дисс}}$, составляющей от $9,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$, от $8,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$, от $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$, от $9,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-8} \text{ с}^{-1}$, от $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-8} \text{ с}^{-1}$, от $9,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, от $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, от $9,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$, от $9,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, от $8,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, от $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ до $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, от $8,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, от $8,5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ до $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$. В определенных вариантах реализации изобретения $k_{\text{дисс}}$ определяют, используя моновалентное антитело, такое как фрагмент Fab, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В других вариантах реализации изобретения $k_{\text{дисс}}$ определяют, используя бивалентное антитело, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В конкретном варианте реализации изобретения $k_{\text{дисс}}$ определяют методом анализа, описанным в разделе 6, ниже.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент связывается с GITR (например, человеческим GITR) с константой скорости ассоциации ($k_{\text{асс}}$), составляющей по меньшей мере $10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $2,5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $3,5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $2,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $3,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ или по меньшей мере $10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент связывается с GITR (например, человеческим GITR) с $k_{\text{асс}}$ от $1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $3,5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $2,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $3,5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $3,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $5 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, от $1 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. В определенных вариантах реализации изобретения $k_{\text{асс}}$ определяют, используя моновалентное антитело, такое как фрагмент Fab, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В других вариантах реализации изобретения $k_{\text{асс}}$ определяют, используя бивалентное антитело, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В конкретном варианте реализации изобретения $k_{\text{асс}}$ определяют методом анализа, описанным в разделе 6, ниже.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент связывается с GITR (например, человеческим GITR) с K_d , составляющей менее 7, 6, 5, 4,5,

4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 или 0,1 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент связывается с GITR (например, человеческим GITR) с K_d , составляющей около 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 или 0,1 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент связывается с GITR (например, от человеческого GITR) с K_d , составляющей от 7 до 2 нМ, от 5 до 3 нМ, от 5 до 1 нМ, от 4 до 3 нМ, от 4 до 2 нМ, от 3 до 2 нМ, от 3 до 1 нМ, от 2 до 1 нМ, от 3 до 0,1 нМ, от 2 до 0,1 нМ, от 1 до 0,1 нМ или от 0,5 до 0,1 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения K_d рассчитывают как отношение $k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$, а $k_{\text{асс}}$ и $k_{\text{дисс}}$ определяют, используя моновалентное антитело, такое как фрагмент Fab, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В других вариантах реализации изобретения K_d рассчитывают как отношение $k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$, а $k_{\text{асс}}$ и $k_{\text{дисс}}$ определяют, используя бивалентное антитело, такое как фрагмент Fab, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В конкретном варианте реализации изобретения K_d рассчитывают как показано в примерах в разделе 6, ниже (например, пример 2). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую:

(a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQSX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇KX₈YLX₉ (SEQ ID NO: 4), где

- X₁ представляет собой L, A, V, I, P, F или M;
- X₂ представляет собой L, A, V, I, P, F, M или S;
- X₃ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₄ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;
- X₅ представляет собой G, N, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₆ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₇ представляет собой Q, G, N, S, T, C, W, Y или A;
- X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₉ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или A; и/или

(b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁ASTRX₂X₃ (SEQ ID NO: 5), где

- X₁ представляет собой W, G, N, Q, S, T, C, Y, F, H или A;
- X₂ представляет собой E, D или A;
- X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A; и/или

(c) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QX₁X₂YX₃X₄PYT (SEQ ID NO: 6), где

- X₁ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W или Y;
- X₂ представляет собой D, E или Y;
- X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;
- X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H, L или A.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или все три вышеприведенные VL CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или все три VL CDR одного из антител из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1, например, все VL CDR антитела 231-32-15). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит описанные в данном документе каркасные области VL. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL (FR) антитела, приведенного в табл. 3 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 3).

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

(a) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 1), в которой

- X₁ представляет собой D, E, G или A;
- X₂ представляет собой A, V, L, I, P, F, M или Y;
- X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F или H; и/или

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂X₃X₄SGX₅X₆X₇YX₈QKFX₉X₁₀ (SEQ ID NO: 2), в которой

X₁ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;
 X₂ представляет собой R, K, H, Q или A;
 X₃ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или P;
 X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или A;
 X₅ представляет собой D, E, G или A;
 X₆ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;
 X₇ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I, P или A;
 X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₉ представляет собой K, R, H, Q или A;
 X₁₀ представляет собой D, E, G или A; и/или

(с) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 3), в которой

X₁ представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S;

X₂ представляет собой A или D;

X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или все три вышеприведенные VH CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2 одного из антител из табл. 2. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или все три VH CDR одного из антител из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2, например, все VH CDR антитела 231-32-15). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит описанные в данном документе каркасные области VH. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VH антитела, приведенного в табл. 4 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 4).

Таблица 1

Аминокислотные последовательности VL CDR¹

Антитело	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
231-32-15	KSSQSLLNSGNQKNYLT (16)	WASTRES (17)	QNDYSYPYT (18)
Hum231#1	KSSQSLLNSGNQKNYLT (16)	WASTRES (17)	QNDYSYPYT (18)
Hum231#2	KSSQSLLNSGNQKNYLT (16)	WASTRES (17)	QNDYSYPYT (18)
pab1964	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (106)
pab1965	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1966	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1967	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
pab1968	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1969	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
pab1970	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
pab1971	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1972	KSSQSLLNSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1973	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1975	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1976	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1977	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1979	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1980	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1981	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1983	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab2159	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
pab2160	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab2161	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
1	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
2	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
3	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
4	KSSQSLLNSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
5	KSSQSLLNSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
6	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)

7	KSSQSLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
8	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
9	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
10	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
11	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
12	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
13	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
14	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
15	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
16	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
17	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
18	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
19	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
20	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
21	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
22	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDHSFPYT (191)
23	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSSPYT (192)
24	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
25	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
26	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
27	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
28	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
29	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
30	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
31	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
32	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
33	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
34	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
35	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
36	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
37	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
38	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
39	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
40	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
41	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
42	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
43	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
44	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
45	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
46	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
47	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
48	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
49	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
50	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
51	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSSPYT (192)
52	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
53	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
54	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)

55	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
56	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
57	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
58	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
59	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
60	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
61	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
62	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
63	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
64	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
65	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
66	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
67	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
68	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
69	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
70	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
71	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
72	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
73	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
74	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
75	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
76	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
77	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
78	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
79	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
80	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
81	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
82	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
83	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
84	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
85	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
86	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
87	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
88	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
89	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
90	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (193)
91	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
92	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
93	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
94	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
95	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
96	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
97	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
98	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
99	KSSQSLLNSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
100	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSSPYT (192)
101	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
102	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
103	KSSQSLLNSSNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSSPYT (192)
104	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
105	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
106	KSSQSLLNSSNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
107	KSSQSLLNSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)

¹ VL CDR в табл. 1 определены по Кабату.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности VH CDR²

Антитело	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
231-32-15	DYAMY (13)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (14)	SGTVRGFAY (15)
Hum231#1	DYAMY (13)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (14)	SGTVRGFAY (15)
Hum231#2	DYAMY (13)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (14)	SGTVRGFAY (15)
pab1964	GYAMY (19)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
pab1965	GYAMY (19)	VIRTFSGDVTYNQKFRG (25)	SGTVRGFAY (34)
pab1966	GYAMY (19)	VIKTYSGGVSYNQKFRG (26)	SGTVRGFAY (34)
pab1967	GYAMH (20)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (27)	SGTVRGFAY (34)
pab1968	DYAMY (21)	VIRTFSGDLTYNQKFQD (28)	SGTVRGFAY (34)
pab1969	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1970	DYAMY (21)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
pab1971	DYAMY (21)	VIRTYSGDVSYNQKFRG (177)	SGTVRGFAY (34)
pab1972	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFRD (31)	SGTVRGFAY (34)
pab1973	GYAMY (19)	VIRTFSGGVSYNQKFRG (32)	SGTVRGFAY (34)
pab1975	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1976	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1977	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1979	EYAMH (22)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (33)	SGTVRGFAY (34)
pab1980	EYAMH (22)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (33)	SGTVRGFAY (34)
pab1981	EYAMH (22)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (33)	SGTVRGFAY (34)
pab1983	GYAMY (19)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
pab2159	GYAMY (19)	LIRTYSGEVSYNQKFRG (144)	SGTVRGFAY (34)
pab2160	GYVMH (119)	VIRTFSGDVSYNQKFRE (162)	SGTVRGFAY (34)
pab2161	EYAMH (22)	LIQTYSGDVSYNQKFRG (121)	SGTVRGFAY (34)
1	EYAMY (23)	VIRTYSGGVSYNQKFQG (187)	SGTVRGFAY (34)
2	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
3	GYVMH (119)	VIRTYSGEVSYNQKFQE (181)	SGTVRGFAY (34)
4	EYAMY (23)	LIRTFSGDVSYNQKFQD (124)	SGTVRGFAY (34)
5	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (151)	SGTVRGFAY (34)
6	EYAMY (23)	LIRTFSGGVSYNQKFKG (135)	SGTVRGFAY (34)
7	GYAMH (20)	LIRTFSGGLSYNQKFRE (132)	SGTVRGFAY (34)
8	GYVMY (116)	VIKTFSGGVSYNQKFQE (152)	SGTVRGFAY (34)
9	GYAMY (19)	LIRTYSGEVSYNQKFRG (144)	SGTVRGFAY (34)
10	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
11	DYAMH (117)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)

12	GYAMY (19)	VIRTFSGEVSYNQKFKG (164)	SGTVRGFAY (34)
13	GYAMY (19)	LIRTFSGDVTYNQKFRG (127)	SGTVRGFAY (34)
14	GYVMH (119)	LIRTYSGDVSYNQKFRD (146)	SGTVRGFAY (34)
15	DYAMY (21)	VIRTFSGDVSYNQKFRE (162)	SGTVRGFAY (34)
16	GYAMY (19)	LIRTFSGGVTYNQKFRE (140)	SGTVRGFAY (34)
17	EYAMY (23)	VIQTFSGGVTYNQKFRG (157)	SGTVRGFAY (34)
18	GYAMY (19)	LIRTFSGEVTYNQKFRG (130)	SGTVRGFAY (34)
19	GYAMY (19)	LIRTYSGGLSYNQKFQD (145)	SGTVRGFAY (34)
20	DYAMY (21)	VIRTFSGDLSYNQKFRG (114)	SGTVRGFAY (34)
21	GYVMH (119)	VIRTFSGDVSYNQKFRE (162)	SGTVRGFAY (34)
22	GYAMY (19)	VIRTFSGDVTYNQKFRG (25)	SGTVRGFAY (34)
23	GYAMY (19)	LIRTFSGDVTYNQKFRG (127)	SGTVRGFAY (34)
24	DYAMH (117)	LIRTYSGGVTYNQKFRG (151)	SGTVRGFAY (34)
25	EYAMY (23)	LIRTFSGGVSYNQKFRG (138)	SGTVRGFAY (34)
26	EYAMH (22)	LIRTFSGDVSYNQKFKG (123)	SGTVRGFAY (34)
27	DYAMY (21)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
28	DYAMY (21)	VIRTFSGGVTYNQKFRG (32)	SGTVRGFAY (34)
29	DYAMY (21)	VIRTFSGGVTYNQKFKG (172)	SGTVRGFAY (34)
30	DYVMY (35)	VIRTFSGGLSYNQKFRG (165)	SGTVRGFAY (34)
31	EYAMY (23)	LIRTFSGGLTYNQKFKD (133)	SGTVRGFAY (34)
32	DYAMY (21)	VIRTFSGGVTYNQKFKD (171)	SGTVRGFAY (34)
33	GYAMY (19)	LIRTYSGGVTYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
34	DYAMY (21)	VIRTFSGGVTYNQKFRG (32)	SGTVRGFAY (34)
35	GYAMY (19)	VIRTFSGDVTYNQKFRG (25)	SGTVRGFAY (34)
36	DYAMY (21)	VIRTFSGGVSYNQKFRD (168)	SGTVRGFAY (34)
37	EYAMY (23)	LIRTFSGEVTYNQKFKD (129)	SGTVRGFAY (34)
38	GYAMY (19)	VIKTYSGGVTYNQKFRG (26)	SGTVRGFAY (34)
39	GYAMH (20)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (27)	SGTVRGFAY (34)
40	EYAMY (23)	VIRTYSGDLSYNQKFRG (174)	SGTVRGFAY (34)
41	DYVMY (35)	VIRTFSGGVSYNQKFRG (170)	SGTVRGFAY (34)
42	DYAMY (21)	VIRTFSGDLTYNQKFQD (28)	SGTVRGFAY (34)
43	EYAMY (23)	LIRTFSGDVSYNQKFKG (123)	SGTVRGFAY (34)
44	EYAMH (22)	LIRTYSGDVSYNQKFQG (142)	SGTVRGFAY (34)
45	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (147)	SGTVRGFAY (34)
46	EYAMY (23)	LIRTFSGDLSYNQKFRG (122)	SGTVRGFAY (34)
47	DYAMY (21)	VIRTYSGGVTYNQKFRD (188)	SGTVRGFAD (189)
48	DYAMY (21)	LIRTYSGGVTYNQKFKE (149)	SGTVRGFAY (34)
49	GYAMY (19)	VIRTYSGDVTYNQKFRE (179)	SGTVRGFAY (34)
50	DYAMY (21)	LIRTFSGGVSYNQKFKE (134)	SGTVRGFAY (34)
51	EYAMY (23)	VIRTFSGGVTYNQKFKG (172)	SGTVRGFAY (34)
52	DYAMY (21)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (27)	SGTVRGFAY (34)
53	EYAMH (22)	VIRTYSGGLSYNQKFRG (182)	SGTVRGFAY (34)
54	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (147)	SGTVRGFAY (34)
55	DYAMY (21)	LIRTYSGGVTYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)

56	DYAMY (21)	VIRTYSGDVSYNQKFRG (177)	SGTVRGFAY (34)
57	GYAMY (19)	LIRTYSGDVTYNQKFKD (143)	SGTVRGFAY (34)
58	DYAMY (21)	VIRTYSGGVTYNQKFKG (186)	SGTVRGFAY (34)
59	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFRD (31)	SGTVRGFAY (34)
60	DYAMY (21)	VIKTYSGGVSYNQKFRG (153)	SGTVRGFAY (34)
61	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQE (115)	SGTVRGFAY (34)
62	GYVMY (116)	VIRTFSGGVSYNQKFQG (167)	SGTVRGFAY (34)
63	EYAMY (23)	VIRTFSGDVTYNQKFKG (163)	SGTVRGFAY (34)
64	DYAMY (21)	VIRTYSGDVTYNQKFRG (180)	SGTVRGFAY (34)
65	EYAMY (23)	VIKTYSGGVTYNQKFRG (26)	SGTVRGFAY (34)
66	DYVMY (35)	VIRTYSGEVSYNQKFRG (183)	SGTVRGFAY (34)
67	EYAMY (23)	VIQTFSGDVSYNQKFKG (156)	SGTVRGFAY (34)
68	GYAMY (19)	LIRTYSGGVTYNQKFRG (151)	SGTVRGFAY (34)
69	EYVMH (118)	VIRTFSGGVSYNQKFRE (169)	SGTVRGFAY (34)
70	GYAMY (19)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (178)	SGTVRGFAY (34)
71	GYAMY (19)	VIRTFSGGVTYNQKFRG (32)	SGTVRGFAY (34)
72	GYAMY (19)	VIRTYSGDVSYNQKFQE (175)	SGTVRGFAY (34)
73	GYVMH (119)	IIKTYSGGVSYNQKFQG (120)	SGTVRGFAY (34)
74	DYAMY (21)	VIKTYSGGVTYNQKFKD (154)	SGTVRGFAY (34)
75	GYAMY (19)	VIRTYSGGVTYNQKFQG (187)	SGTVRGFAY (34)
76	DYAMH (117)	LIRTFSGDVSYNQKFRE (125)	SGTVRGFAY (34)
77	EYAMH (22)	LIQTYSGDVSYNQKFRG (121)	SGTVRGFAY (34)
78	DYAMY (21)	VIKTYSGGVTYNQKFRD (155)	SGTVRGFAY (34)
79	EYAMH (22)	LIRTYSGGVTYNQKFRE (150)	SGTVRGFAY (34)
80	EYAMH (22)	LIRTFSGDVSYNQKFRG (126)	SGTVRGFAY (34)
81	DYAMY (21)	LIRTFSGEVSYNQKFQD (128)	SGTVRGFAY (34)
82	GYVMH (119)	VIRTFSGGVSYNQKFRG (170)	SGTVRGFAY (34)
83	GYAMY (19)	VIRTFSGDVSYNQKFRD (161)	SGTVRGFAY (34)
84	GYAMY (19)	LIRTFSGDVTYNQKFRG (127)	SGTVRGFAY (34)
85	EYAMY (23)	VIRTYSGGVTYNQKFKD (185)	SGTVRGFAY (34)
86	EYAMY (23)	VIRTYSGGVTYNQKFRD (188)	SGTVRGFAY (34)
87	GYAMY (19)	VIRTFSGDLSYNQKFKG (159)	SGTVRGFAY (34)
88	EYAMH (22)	VIRTYSGDVSYNQKFRG (177)	SGTVRGFAY (34)
89	GYAMY (19)	VIRTFSGDVTYNQKFRG (25)	SGTVRGFAY (34)
90	EYAMY (23)	LIRTYSGDLSYNQKFKE (141)	SGTVRGFAY (34)
91	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQE (115)	SGTVRGFAY (34)
92	EYAMY (23)	LIRTFSGGVTYNQKFQG (139)	SGTVRGFAY (34)
93	DYAMH (117)	VIQTYSGDVSYNQKFQG (158)	SGTVRGFAY (34)
94	GYAMY (19)	VIRTFSGGVTYNQKFRD (173)	SGTVRGFAY (34)
95	DYAMY (21)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
96	EYAMY (23)	VIRTYSGGLTYNQKFRD (184)	SGTVRGFAY (34)
97	EYAMH (22)	LIRTFSGGLSYNQKFRD (131)	SGTVRGFAY (34)
98	GYAMH (20)	VIRTFSGGVSYNQKFQE (166)	SGTVRGFAY (34)
99	DYAMH (117)	LIRTFSGDLSYNQKFRG (122)	SGTVRGFAY (34)
100	EYAMH (22)	VIRTFSGGVSYNQKFQG (167)	SGTVRGFAY (34)
101	DYAMH (117)	LIRTFSGGVSYNQKFQD (136)	SGTVRGFAY (34)
102	GYAMY (19)	VIRTYSGGVSYNQKFRD (194)	SGTVRGFAY (34)
103	GYAMY (19)	VIRTYSGDVSYNQKFRG (177)	SGTVRGFAY (34)
104	DYAMY (21)	LIRTFSGGVSYNQKFRD (137)	SGTVRGFAY (34)
105	EYAMY (23)	LIRTFSGGVSYNQKFKG (135)	SGTVRGFAY (34)
106	DYAMY (21)	VIRTFSGDVSYNQKFQE (160)	SGTVRGFAY (34)
107	GYAMY (19)	VIRTYSGDVSYNQKFRD (176)	SGTVRGFAY (34)

² VH CDR в табл. 1 определены по Кабату.

Таблица 3

Аминокислотные последовательности VL FR³

Антитело	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
231-32-15	DIVMTQSPSSLTVTA GEKVIMSC (616)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLT SSVQAEDVAVYHC (637)	FGGGTKLEIK (641)
Hum231 #1	DIVMTQSPPTLSLSP GERVTLS (615)	WYQQKPGQA PRLLIY (622)	GIPARFSGSGSGDFTLT SLQPEDFAVYHC (626)	FGGGTKLEIK (643)
Hum231 #2	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSLQAEDVAVYHC (630)	FGGGTKLEIK (643)
pab1964	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGGGTKLEIK (643)
pab1965	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGDFTLT SSVQAEDVAVYHC (639)	FGGGTKLEIK (643)
pab1966	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSLQAEDVAVYHC (631)	FGGGTKLEIK (643)
pab1967	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLT SSVQAEDVAVYHC (638)	FGGGTKLEIK (643)
pab1968	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSLQAEDVAVYHC (631)	FGGGTKLEIK (643)
pab1969	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLT SSVQAEDVAVYHC (638)	FGGGTKLEIK (643)
pab1970	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGGGTKLEIK (643)
pab1971	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLT SSLQAEDVAVYHC (642)	FGGGTKLEIK (643)
pab1972	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGGGTKLEIK (643)
pab1973	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSDTFTLT SSVQAEDVAVYHC (627)	FGGGTKLEIK (643)
pab1975	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSLQAEDVAVYHC (631)	FGGGTKLEIK (643)
pab1976	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLT SSLQAEDVAVYHC (631)	FGGGTKLEIK (643)
pab1977	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLT SSLQAEDVAVYHC (642)	FGGGTKLEIK (643)

pab1979	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1980	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1981	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
pab1983	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab2159	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
pab2160	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
pab2161	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
1	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
2	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
3	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
4	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
5	DIVMTQSPDSLAA PG ERATINC (610)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
6	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
7	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
8	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
9	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
10	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
11	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
12	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
13	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
14	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
15	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
16	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)

17	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
18	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
19	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
20	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLLY (624)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (620)	FGQGTKLEIK (643)
21	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
22	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
23	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
24	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
25	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
26	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
27	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
28	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
29	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
30	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
31	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
32	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
33	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
34	DIVMTQSTD SLAVSL GERATINC (617)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
35	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
36	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (634)	FGQGTKLEIK (643)
37	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
38	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
39	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)

40	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
41	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
42	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
43	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
44	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
45	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
46	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
47	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
48	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
49	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
50	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
51	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
52	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
53	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
54	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
55	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
56	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
57	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
58	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
59	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
60	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
61	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
62	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)

63	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
64	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
65	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (612)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGDFTLTI SFVQAEDVAVYYC (628)	FGQGTKLEIK (643)
66	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
67	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
68	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
69	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
70	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
71	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
72	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
73	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
74	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
75	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
76	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
77	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
78	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
79	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
80	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
81	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (613)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
82	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
83	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
84	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTSGSGDFTLTI SSLQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
85	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGDFTLTI SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)

86	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
87	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
88	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
89	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
90	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
91	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
92	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (635)	FGQGTKLEIK (643)
93	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
94	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
95	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
96	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
97	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
98	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
99	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKMLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
100	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKMLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
101	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
102	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
103	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
104	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSFQAEDVAVYYHC (629)	FGQGTKLEIK (643)
105	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKLLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
106	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYQQKPGQP PKSLIY (625)	GVPDRFSGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
107	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINC (611)	WYHQKPGQP PKLLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)

³ Описанные в табл. 3 каркасные области VL определены на основании границ для CDR по системе нумерации Кабата. Другими словами, VL CDR определены по Кабату, а каркасные области представляют аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельной области, в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Таблица 4

Аминокислотные последовательности VH FR⁴

Антитело	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
231-32-15	QVQLVQSGTELVKPGSV KISCKGSGYTFT (645)	WVKQSHAKSLE WIG (652)	KATMTVDKSSSIAYMELAR LSEDSAIYYCAK (658)	WGQGLTVTVSS (668)
Hum231#1	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
Hum231#2	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1964	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1965	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (646)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1966	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1967	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (667)
pab1968	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1969	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1970	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1971	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1972	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1973	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1975	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1976	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1977	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1979	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1980	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1981	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab1983	QVQLVQSGAEVKKPGAS	WVRQAPGQGME	RVTMTVDTISISTAYMELSR	WGQGLTVTVSS

	VKVSCKASGYTFT (648)	WIG (655)	LRSDDTAVYYCAK (663)	(668)
pab2159	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
pab2160	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
pab2161	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
1	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
2	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
3	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
4	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQSLE WMG (657)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
5	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
6	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
7	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
8	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
9	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
10	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
11	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
12	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
13	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
14	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
15	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGSYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
16	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
17	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
18	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)

19	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
20	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
21	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
22	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
23	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
24	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKASCKGSGYTFT (647)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
25	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
26	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
27	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
28	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
29	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
30	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
31	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (664)
32	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
33	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
34	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
35	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (646)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
36	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
37	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
38	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
39	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (667)
40	QVQLVQSGAEVKKPGAS	WVRQAPGQGLE	RVTMTVDKSISTAYMELSR	WGQGLTVTVSS

	VKVSCKASGYTFT (648)	WIG (653)	LRSDDTAVYYCAK (662)	(668)
41	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
42	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
43	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
44	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
45	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (665)
46	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
47	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
48	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
49	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
50	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
51	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
52	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
53	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
54	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
55	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
56	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
57	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
58	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
59	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
60	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
61	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)

62	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLVTVSS (668)
63	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLVTVSS (668)
64	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
65	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLVTVSS (668)
66	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLVTVSS (668)
67	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLVTVSS (668)
68	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLVTVSS (668)
69	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
70	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
71	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
72	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
73	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLVTVSS (668)
74	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
75	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLVTVSS (668)
76	QVQLVQSGAGVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (644)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLVTVSS (668)
77	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
78	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLE WIG (653)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRGDDTAVYYCAK (661)	WGRGLVTVSS (669)
79	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLVTVSS (668)
80	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLVTVSS (668)
81	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (650)	WVRQAPGQGLE WMG (654)	RATMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLVTVSS (668)
82	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLVTVSS (668)
83	QVQLVQSGAEVKKPGAS	WVRQAPGQGME	RVTMTVDTSISTAYMELSR	WGQGLVTVSS

	VKVSCKSGYTFT (649)	WMG (656)	LRSDDTAVYYCAK (663)	(668)
84	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
85	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (654)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
86	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
87	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
88	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (654)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
89	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
90	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WIG (653)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
91	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
92	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (654)	RATMTVDTISISTAYMELSR LQSDDTAVYYCAK (660)	WGQGLTVTVSS (668)
93	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
94	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (666)
95	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (666)
96	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
97	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (655)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
98	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
99	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
100	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RATMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (670)	WGQGLTVTVSS (668)
101	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (662)	WGQGLTVTVSS (668)
102	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (650)	WVRQAPGQGME WIG (653)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
103	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (648)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
104	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WMG (656)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
105	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)
106	QVQLVQSGTEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (651)	WVRQAPGQGME WIG (653)	RATMTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (659)	WGQGLTVTVSS (668)
107	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKSGYTFT (649)	WVRQAPGQGME WMG (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAK (663)	WGQGLTVTVSS (668)

⁴ Описанные в табл. 4 каркасные области VH определены на основании границ для CDR по системе нумерации Кабата. Другими словами, VH CDR определены по Кабату, а каркасные области представляют аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариабельной области, в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую:

(a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇KX₈YLX₉ (SEQ ID NO: 4), где

X₁ представляет собой L, A, V, I, P, F или M;

X₂ представляет собой L, A, V, I, P, F, M или S;
 X₃ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₄ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;
 X₅ представляет собой G, N, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₆ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₇ представляет собой Q, G, N, S, T, C, W, Y или A;
 X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₉ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или A; и/или

(b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁ASTRX₂X₃ (SEQ ID NO: 5), где

X₁ представляет собой W, G, N, Q, S, T, C, Y, F, H или A;
 X₂ представляет собой E, D или A;
 X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A; и/или

(c) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QX₁X₂YX₃X₄PYT (SEQ ID NO: 6), где

X₁ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W или Y;
 X₂ представляет собой D, E или Y;
 X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;
 X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H, L или A.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или все три вышеприведенные VL CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1 одного из антител из табл. 5. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2 одного из антител из табл. 5. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3 одного из антител из табл. 5. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VL CDR одного из антител из табл. 5 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 5, например, все VL CDR антитела 231-32-15). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит описанные в данном документе каркасные области VL. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL (FR) антитела, приведенного в табл. 7 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 7).

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариативную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

(a) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 1), в которой

X₁ представляет собой D, E, G или A;
 X₂ представляет собой A, V, L, I, P, F, M или Y;
 X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F или H; и/или

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂X₃X₄SGX₅X₆X₇YX₈QKFX₉X₁₀ (SEQ ID NO: 2), в которой

X₁ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;
 X₂ представляет собой R, K, H, Q или A;
 X₃ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или P;
 X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или A;
 X₅ представляет собой D, E, G или A;
 X₆ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;
 X₇ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I, P или A;
 X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
 X₉ представляет собой K, R, H, Q или A;
 X₁₀ представляет собой D, E, G или A; и/или

(c) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 3), в которой

X₁ представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S;
 X₂ представляет собой A или D;
 X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три вышеприведенные VH CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1 одного из антител из табл. 6. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2 одного из антител из табл. 6. В определенных вариантах реализации изобрете-

ния антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3 одного из антител из табл. 6. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VH CDR одного из антител из табл. 6 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 6, например, все VH CDR антитела 231-32-15). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит описанные в данном документе каркасные области VH. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VH антитела, приведенного в табл. 8 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 8).

Таблица 5

Аминокислотные последовательности VL CDR¹

Антитело	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
231-32-15	KSSQSLNLSGNQKNYLT (16)	WASTRES (17)	QNDYSYPYT (18)
Hum231#1	KSSQSLNLSGNQKNYLT (16)	WASTRES (17)	QNDYSYPYT (18)
Hum231#2	KSSQSLNLSGNQKNYLT (16)	WASTRES (17)	QNDYSYPYT (18)
pab1964	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
pab1965	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1966	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1967	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
pab1968	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1969	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
pab1970	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
pab1971	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1972	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1973	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1975	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1976	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1977	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1979	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1980	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1981	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab1983	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab2159	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
pab2160	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
pab2161	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
1	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
2	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
4	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
5	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
6	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
9	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
10	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
11	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
15	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
16	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
18	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
20	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
21	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
25	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
29	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
31	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
33	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
34	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
35	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
36	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
37	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSYPYT (106)
38	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
39	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
42	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
43	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
45	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
46	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
47	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
49	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
50	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
52	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
54	KSSQSLNLSGNQKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
55	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
58	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
59	KSSQSLNLSGNQKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)

61	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
68	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
70	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
71	KSSQSLNLSNQNKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
75	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
76	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
78	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
79	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
80	KSSQSLNLSNQNKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
85	KSSQSLNLSNQNKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
86	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
91	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
92	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
94	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
95	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
96	KSSQSLNLSNQNKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
97	KSSQSLNLSGNQKNYLT (102)	WASTRES (105)	QNEYSFPYT (108)
101	KSSQSLNLSNQNKNYLT (103)	WASTRES (105)	QNDYSFPYT (109)
102	KSSQSLNLSNQNKNYLS (104)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
105	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)
107	KSSQSLNLSGNQKNYLS (101)	WASTRES (105)	QNDYSYPYT (107)

¹ VL CDR в табл. 5 определены по Кабату.

Таблица 6

Аминокислотные последовательности VH CDR²

Антитело	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
231-32-15	DYAMY (13)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (14)	SGTVRGFAY (15)
Hum231#1	DYAMY (13)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (14)	SGTVRGFAY (15)
Hum231#2	DYAMY (13)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (14)	SGTVRGFAY (15)
pab1964	GYAMY (19)	LIRTYSGGVVTYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
pab1965	GYAMY (19)	VIRTFSGDVTYNQKFRG (25)	SGTVRGFAY (34)
pab1966	GYAMY (19)	VIKTYSGGVVTYNQKFRG (26)	SGTVRGFAY (34)
pab1967	GYAMH (20)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (27)	SGTVRGFAY (34)
pab1968	DYAMY (21)	VIRTFSGDLTYNQKFQD (28)	SGTVRGFAY (34)
pab1969	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1970	DYAMY (21)	LIRTYSGGVVTYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
pab1971	DYAMY (21)	VIRTYSGDVSYNQKFRG (177)	SGTVRGFAY (34)
pab1972	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFRD (31)	SGTVRGFAY (34)
pab1973	GYAMY (19)	VIRTFSGGVVTYNQKFRG (32)	SGTVRGFAY (34)
pab1975	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1976	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1977	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (29)	SGTVRGFAY (34)
pab1979	EYAMH (22)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (33)	SGTVRGFAY (34)
pab1980	EYAMH (22)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (33)	SGTVRGFAY (34)
pab1981	EYAMH (22)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (33)	SGTVRGFAY (34)
pab1983	GYAMY (19)	LIRTYSGGVVTYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
pab2159	GYAMY (19)	LIRTYSGEVSYNQKFRG (144)	SGTVRGFAY (34)
pab2160	GYVMH (119)	VIRTFSGDVSYNQKFRE (162)	SGTVRGFAY (34)
pab2161	EYAMH (22)	LIQTYSGDVSYNQKFRG (121)	SGTVRGFAY (34)
1	EYAMY (23)	VIRTYSGGVVTYNQKFQG (187)	SGTVRGFAY (34)

2	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
4	EYAMY (23)	LIRTFSGDVSYNQKFQD (124)	SGTVRGFAY (34)
5	EYAMH (22)	LIRTYSGGVVTYNQKFRG (151)	SGTVRGFAY (34)
6	EYAMY (23)	LIRTFSGGVSYNQKFKG (135)	SGTVRGFAY (34)
9	GYAMY (19)	LIRTYSGEVSYNQKFRG (144)	SGTVRGFAY (34)
10	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
11	DYAMH (117)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
15	DYAMY (21)	VIRTFSGDVSYNQKFRE (162)	SGTVRGFAY (34)
16	GYAMY (19)	LIRTFSGGVVTYNQKFRE (140)	SGTVRGFAY (34)
18	GYAMY (19)	LIRTFSGEVVTYNQKFRG (130)	SGTVRGFAY (34)
20	DYAMY (21)	VIRTFSGDLSYNQKFRG (114)	SGTVRGFAY (34)
21	GYVMH (119)	VIRTFSGDVSYNQKFRE (162)	SGTVRGFAY (34)
25	EYAMY (23)	LIRTFSGGVSYNQKFRG (138)	SGTVRGFAY (34)
29	DYAMY (21)	VIRTFSGGVVTYNQKFKG (172)	SGTVRGFAY (34)
31	EYAMY (23)	LIRTFSGGLTYNQKFKD (133)	SGTVRGFAY (34)
33	GYAMY (19)	LIRTYSGGVVTYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
34	DYAMY (21)	VIRTFSGGVVTYNQKFRG (32)	SGTVRGFAY (34)
35	GYAMY (19)	VIRTFSGDVTYNQKFRG (25)	SGTVRGFAY (34)
36	DYAMY (21)	VIRTFSGGVSYNQKFRD (168)	SGTVRGFAY (34)
37	EYAMY (23)	LIRTFSGEVVTYNQKFKD (129)	SGTVRGFAY (34)
38	GYAMY (19)	VIKTYSGGVVTYNQKFRG (26)	SGTVRGFAY (34)
39	GYAMH (20)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (27)	SGTVRGFAY (34)
42	DYAMY (21)	VIRTFSGDLTYNQKFQD (28)	SGTVRGFAY (34)
43	EYAMY (23)	LIRTFSGDVSYNQKFKG (123)	SGTVRGFAY (34)
45	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (147)	SGTVRGFAY (34)
46	EYAMY (23)	LIRTFSGDLSYNQKFRG (122)	SGTVRGFAY (34)
47	DYAMY (21)	VIRTYSGGVVTYNQKFRD (188)	SGTVRGFAD (189)
49	GYAMY (19)	VIRTYSGDVTYNQKFRE (179)	SGTVRGFAY (34)
50	DYAMY (21)	LIRTFSGGVSYNQKFKE (134)	SGTVRGFAY (34)
52	DYAMY (21)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (27)	SGTVRGFAY (34)
54	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQG (147)	SGTVRGFAY (34)
55	DYAMY (21)	LIRTYSGGVVTYNQKFQG (24)	SGTVRGFAY (34)
58	DYAMY (21)	VIRTYSGGVVTYNQKFKG (186)	SGTVRGFAY (34)
59	EYAMY (23)	LIRTYSGGVSYNQKFRD (31)	SGTVRGFAY (34)
61	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQE (115)	SGTVRGFAY (34)
68	GYAMY (19)	LIRTYSGGVVTYNQKFRG (151)	SGTVRGFAY (34)
70	GYAMY (19)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (178)	SGTVRGFAY (34)
71	GYAMY (19)	VIRTFSGGVVTYNQKFRG (32)	SGTVRGFAY (34)
75	GYAMY (19)	VIRTYSGGVVTYNQKFQG (187)	SGTVRGFAY (34)
76	DYAMH (117)	LIRTFSGDVSYNQKFRE (125)	SGTVRGFAY (34)
78	DYAMY (21)	VIKTYSGGVVTYNQKFRD (155)	SGTVRGFAY (34)
79	EYAMH (22)	LIRTYSGGVVTYNQKFRE (150)	SGTVRGFAY (34)
80	EYAMH (22)	LIRTFSGDVSYNQKFRG (126)	SGTVRGFAY (34)
85	EYAMY (23)	VIRTYSGGVVTYNQKFKD (185)	SGTVRGFAY (34)
86	EYAMY (23)	VIRTYSGGVVTYNQKFRD (188)	SGTVRGFAY (34)
91	EYAMH (22)	LIRTYSGGVSYNQKFQE (115)	SGTVRGFAY (34)
92	EYAMY (23)	LIRTFSGGVVTYNQKFQG (139)	SGTVRGFAY (34)
94	GYAMY (19)	VIRTFSGGVVTYNQKFRD (173)	SGTVRGFAY (34)
95	DYAMY (21)	LIRTYSGGVSYNQKFRG (148)	SGTVRGFAY (34)
96	EYAMY (23)	VIRTYSGGLTYNQKFRD (184)	SGTVRGFAY (34)
97	EYAMH (22)	LIRTFSGGLSYNQKFRD (131)	SGTVRGFAY (34)
101	DYAMH (117)	LIRTFSGGVSYNQKFQD (136)	SGTVRGFAY (34)
102	GYAMY (19)	VIRTYSGGVSYNQKFRD (194)	SGTVRGFAY (34)
105	EYAMY (23)	LIRTFSGGVSYNQKFKG (135)	SGTVRGFAY (34)
107	GYAMY (19)	VIRTYSGDVSYNQKFRD (176)	SGTVRGFAY (34)

² VH CDR в табл. 6 определены по Кабату.

Таблица 7

Аминокислотные последовательности VL FR³

Антитело	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
231-32-15	DIVMTQSPSSSLTVTAG EKVIMSC (616)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDLAVYHC (637)	FGGGTKLEIK (641)
Hum231 #1	DIVMTQSPPTLSLSPG ERVTLSC (615)	WYQQKPGQAPR LLIY (622)	GIPARFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFAVYHC (626)	FGQGTKLEIK (643)
Hum231 #2	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
pab1964	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQQPGQPFPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
pab1965	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQQPGQPFPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
pab1966	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1967	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
pab1968	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1969	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
pab1970	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
pab1971	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
pab1972	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQQPGQPFPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
pab1973	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSDTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (627)	FGQGTKLEIK (643)
pab1975	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1976	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1977	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
pab1979	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1980	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab1981	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
pab1983	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
pab2159	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPFPK MLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)

pab2160	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
pab2161	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
1	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK MLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
2	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
4	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
5	DIVMTQSPDSLAAAPGE RATINC (610)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
6	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
9	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
10	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
11	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
15	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
16	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
18	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK MLIY (619)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
20	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (620)	FGQGTKLEIK (643)
21	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
25	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
29	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
31	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
33	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
34	DIVMTQSTDSLAVSLG ERATINC (617)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
35	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
36	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK MLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQEDVAVYHC (634)	FGQGTKLEIK (643)
37	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)

38	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
39	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
42	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
43	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
45	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
46	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (636)	FGQGTKLEIK (643)
47	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
49	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
50	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
52	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
54	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
55	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
58	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
59	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
61	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
68	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
70	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
71	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
75	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)
76	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
78	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK MLIY (619)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
79	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK MLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (631)	FGQGTKLEIK (643)
80	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYC (642)	FGQGTKLEIK (643)

85	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
86	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
91	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
92	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK MLIY (619)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYHC (635)	FGQGTKLEIK (643)
94	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
95	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK MLIY (624)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
96	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYHC (630)	FGQGTKLEIK (643)
97	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYHC (638)	FGQGTKLEIK (643)
101	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYHC (632)	FGQGTKLEIK (643)
102	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)
105	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYQQKPGQPPK LLIY (623)	GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYYC (633)	FGQGTKLEIK (643)
107	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC (611)	WYHQKPGQPPK LLIY (618)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS VQAEDVAVYYC (639)	FGQGTKLEIK (643)

³ Описанные в табл. 7 каркасные области VL определены на основании границ для CDR по системе нумерации Кабата. Другими словами, VL CDR определены по Кабату, а каркасные области представляют аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельной области, в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Таблица 8

Аминокислотные последовательности VH FR⁴

Антитело	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
231-32-15	QVQLLQSGTELVKPGSVKVI SCKGSGYTFT (645)	WVKQSHAKSLEWI G (652)	KATMTVDKSSSIAYMELARLS SEDSAIYYCAK (658)	WGQGTLLTVSS (668)
Hum231#1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RATMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
Hum231#2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RATMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1964	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGMWFI G (655)	RVTMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1965	QVQLVQSGAEAKKPGASVKV SCKGSGYTFT (646)	WVRQAPGQGMWFI G (655)	RVTMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1966	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)

pab1967	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (667)
pab1968	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1969	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1970	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1971	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1972	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDKISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1973	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1975	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1976	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1977	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1979	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1980	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1981	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab1983	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGMWEM G (655)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab2159	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDKISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
pab2160	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGMWEM G (655)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
pab2161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
1	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGMWEM G (655)	RATMTVDKISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (657)	RVTMTVDKISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)

9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGGGLEWM G (654)	RATMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGGGLEWM G (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGGGLEWM G (654)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGGGLEWI G (653)	RATMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
16	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGGGLEWI G (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
18	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
20	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGGGLEWI G (653)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
21	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGGGLEWM G (654)	RATMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
29	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGGGLEWI G (653)	RATMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
31	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGGGLEWM G (654)	RVTMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGIPVTSS (664)
33	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
35	QVQLVQSGAEAKKPGASVKV SCKGSGYTFT (646)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
36	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RVTMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
37	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
38	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGGGLEWI G (653)	RVTMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
39	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGGGLEWM G (654)	RATMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (667)
42	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGGGLEWI G (653)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
43	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGGMEWI G (655)	RATMTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGGGLEWI G (653)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTFTVSS (665)
46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGGGLEWM G (654)	RVTMTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)

47	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
49	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
50	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
52	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
55	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
59	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
61	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
68	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
70	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGMWEM G (655)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
71	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
75	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
76	QVQLVQSGAGVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (644)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (659)	WGQGTLLTVSS (668)
78	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR GDDTAVYYCAK (661)	WGRGTLTVSS (669)
79	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTLLTVSS (668)
80	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RVTMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTLLTVSS (668)
85	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
86	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
91	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RATMTVDTSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (670)	WGQGTLLTVSS (668)
92	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RATMTVDTSI STAYMELSRLQ SDDTAVYYCAK (660)	WGQGTLLTVSS (668)
94	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDKSI STAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTFTVSS (666)

95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTFTVSS (666)
96	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGMWEM G (656)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTFTVSS (668)
97	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (651)	WVRQAPGQGMWEM G (655)	RVTMTVDKISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTFTVSS (668)
101	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (648)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDKISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (662)	WGQGTFTVSS (668)
102	QVQLVQSGTEVKKPGASVKV SCKASGYTFT (650)	WVRQAPGQGLEWI G (653)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTFTVSS (668)
105	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTFTVSS (668)
107	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKGSGYTFT (649)	WVRQAPGQGLEWM G (654)	RVTMTVDTISISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAK (663)	WGQGTFTVSS (668)

⁴ Описанные в табл. 8 каркасные области VH определены на основании границ для CDR по системе нумерации Кабата. Другими словами, VH CDR определены по Кабату, а каркасные области представляют аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариационной области, в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти тело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит:

(a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQSX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇KX₈YLYX₉ (SEQ ID NO: 4), где

- X₁ представляет собой L, A, V, I, P, F или M;
- X₂ представляет собой L, A, V, I, P, F, M или S;
- X₃ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₄ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;
- X₅ представляет собой G, N, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₆ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₇ представляет собой Q, G, N, S, T, C, W, Y или A;
- X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₉ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или A; и/или

(b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁ASTRX₂X₃ (SEQ ID NO: 5), где

- X₁ представляет собой W, G, N, Q, S, T, C, Y, F, H или A;
- X₂ представляет собой E, D или A;
- X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A; и/или

(c) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QX₁X₂YX₃X₄PYT (SEQ ID NO: 6), где

- X₁ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W или Y;
- X₂ представляет собой D, E или Y;
- X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;
- X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H, L или A; и/или

(d) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 1), в которой

- X₁ представляет собой D, E, G или A;
- X₂ представляет собой A, V, L, I, P, F, M или Y;
- X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F или H; и/или

(e) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂X₃X₄SGX₅X₆X₇YX₈QKFX₉X₁₀ (SEQ ID NO: 2), в которой

- X₁ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;
- X₂ представляет собой R, K, H, Q или A;
- X₃ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или P;
- X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или A;
- X₅ представляет собой D, E, G или A;
- X₆ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;
- X₇ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I, P или A;
- X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;
- X₉ представляет собой K, R, H, Q или A;
- X₁₀ представляет собой D, E, G или A; и/или

(f) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 3), в которой

X₁ представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S;

X₂ представляет собой A или D;

X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три, четыре, пять или все шесть вышеприведенные CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2 одного из антител из табл. 2. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VH CDR одного из антител из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2, например, все VH CDR антитела 231-32-15). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VL CDR одного из антител из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1, например, все VL CDR антитела 231-32-15).

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и вариабельную область тяжелой цепи (VH), при этом (i) VL содержит:

(a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQSX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇KX₈YLX₉ (SEQ ID NO: 4), где

X₁ представляет собой L, A, V, I, P, F или M;

X₂ представляет собой L, A, V, I, P, F, M или S;

X₃ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X₄ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;

X₅ представляет собой G, N, Q, S, T, C, W, Y или A;

X₆ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X₇ представляет собой Q, G, N, S, T, C, W, Y или A;

X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X₉ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или A; и/или

(b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁ASTRX₂X₃ (SEQ ID NO: 5), где

X₁ представляет собой W, G, N, Q, S, T, C, Y, F, H или A;

X₂ представляет собой E, D или A;

X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A; и/или

(c) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QX₁X₂YX₃X₄PYT (SEQ ID NO: 6), где

X₁ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W или Y;

X₂ представляет собой D, E или Y;

X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A;

X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H, L или A; и

(ii) VH содержит:

(a) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 1), в которой

X₁ представляет собой D, E, G или A;

X₂ представляет собой A, V, L, I, P, F, M или Y;

X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F или H; и/или

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂X₃X₄SGX₅X₆X₇YX₈QKFX₉X₁₀ (SEQ ID NO: 2), в которой

X₁ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;

X₂ представляет собой R, K, H, Q или A;

X₃ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или P;

X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или A;

X₅ представляет собой D, E, G или A;

X₆ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T;

X₇ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I, P или A;

X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A;

X₉ представляет собой K, R, H, Q или A;

X₁₀ представляет собой D, E, G или A; и/или

(с) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 3), в которой

X₁ представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S;

X₂ представляет собой A или D;

X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V.

В конкретных вариантах реализации изобретения VL содержит один, два или все три вышеприведенные VL CDR и/или VH содержит одну, две или все три вышеприведенные VH CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2 одного из антител из табл. 2. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VH CDR одного из антител из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VL CDR одного из антител из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1). В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую:

(a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQSLNSX₁NQKNYLX₂ (SEQ ID NO: 10), в которой

X₁ представляет собой G или S;

X₂ представляет собой T или S; и/или

(b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности WASTRES (SEQ ID NO: 11); и/или

(с) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QNX₁YSX₂PYT (SEQ ID NO: 12), в которой

X₁ представляет собой D или E;

X₂ представляет собой Y, F или S.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или все три вышеприведенные VL CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VL CDR одного из антител из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит описанные в данном документе каркасные области VL. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL (FR) антитела, приведенного в табл. 3 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 3).

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

(a) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 7), в которой

X₁ представляет собой D, E или G;

X₂ представляет собой A или V;

X₃ представляет собой Y или H; и/или

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂TX₃SGX₄X₅X₆YNQKFX₇X₈ (SEQ ID NO: 8), в которой

X₁ представляет собой V или L;

X₂ представляет собой R, K или Q;

X₃ представляет собой Y или F;

X₄ представляет собой D, E или G;
 X₅ представляет собой V или L;
 X₆ представляет собой T или S;
 X₇ представляет собой K, R или Q;
 X₈ представляет собой D, E или G; и/или

(с) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 9).

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или все три вышеприведенные VH CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2 одного из антител из табл. 2. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VH CDR одного из антител из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VH CDR одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит описанные в данном документе каркасные области VH. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VH антитела, приведенного в табл. 4 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 4).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит:

(a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQSLLNSX₁NQKNYLX₂ (SEQ ID NO: 10), в которой

X₁ представляет собой G или S;
 X₂ представляет собой T или S; и/или

(b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности WASTRES (SEQ ID NO: 11); и/или

(с) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QNX₁YSX₂PYT (SEQ ID NO: 12), в которой

X₁ представляет собой D или E;
 X₂ представляет собой Y, F или S.

(d) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 7), в которой

X₁ представляет собой D, E или G;
 X₂ представляет собой A или V;
 X₃ представляет собой Y или H; и/или

(e) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂TX₃SGX₄X₅X₆YNQKFX₇X₈ (SEQ ID NO: 8), в которой

X₁ представляет собой V или L;
 X₂ представляет собой R, K или Q;
 X₃ представляет собой Y или F;
 X₄ представляет собой D, E или G;
 X₅ представляет собой V или L;
 X₆ представляет собой T или S;
 X₇ представляет собой K, R или Q;
 X₈ представляет собой D, E или G; и/или

(f) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 9).

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три, четыре, пять или все шесть вышеприведенные CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1 одного из антител из табл. 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2 одного из антител из табл. 2. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3 одного из антител из табл. 2. В

некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VH CDR одного из антител из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VL CDR одного из антител из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и вариабельную область тяжелой цепи (VH), при этом

- (i) VL содержит:
 - (a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQSLLSX₁NQKNYLX₂ (SEQ ID NO: 10), в которой X₁ представляет собой G или S; X₂ представляет собой T или S; и/или
 - (b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности WASTRES (SEQ ID NO: 11); и/или
 - (c) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QNX₁YSX₂PYT (SEQ ID NO: 12), в которой X₁ представляет собой D или E; X₂ представляет собой Y, F или S; и
- (ii) VH содержит:
 - (a) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 7), в которой X₁ представляет собой D, E или G; X₂ представляет собой A или V; X₃ представляет собой Y или H; и/или
 - (b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂TX₃SGX₄X₅X₆YNQKFX₇X₈ (SEQ ID NO: 8), в которой X₁ представляет собой V или L; X₂ представляет собой R, K или Q; X₃ представляет собой Y или F; X₄ представляет собой D, E или G; X₅ представляет собой V или L; X₆ представляет собой T или S; X₇ представляет собой K, R или Q; X₈ представляет собой D, E или G; и/или
 - (c) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 9).

В конкретных вариантах реализации изобретения VL содержит одну, две или все три вышеприведенные VL CDR и/или VH содержит одну, две или все три вышеприведенные VH CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR1 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR2 одного из антител из табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL CDR3 одного из антител из табл. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR1 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR2 одного из антител из табл. 2. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH CDR3 одного из антител из табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VH CDR одного из антител из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один, два или все три VL CDR одного из антител из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и вариабельную область тяжелой цепи (VH), при этом

- (i) VL содержит:
 - (a) VL CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности KSSQSLLSX₁NQKNYLX₂ (SEQ ID NO: 10), в которой X₁ представляет собой G или S; X₂ представляет собой T или S; и/или
 - (b) VL CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности WASTRES (SEQ ID NO: 11); и/или

(с) VL CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности QNX₁YSX₂PYT (SEQ ID NO: 12), в которой

X₁ представляет собой D или E;

X₂ представляет собой Y, F или S; и

(ii) VH содержит:

(а) VH CDR1, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 7), в которой

X₁ представляет собой D, E или G;

X₂ представляет собой A или V;

X₃ представляет собой Y или H; и/или

(b) VH CDR2, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности X₁IX₂TX₃SGX₄X₅X₆YNQKFX₇X₈ (SEQ ID NO: 8), в которой

X₁ представляет собой V или L;

X₂ представляет собой R, K или Q;

X₃ представляет собой Y или F;

X₄ представляет собой D, E или G;

X₅ представляет собой V или L;

X₆ представляет собой T или S;

X₇ представляет собой K, R или Q;

X₈ представляет собой D, E или G; и/или

(с) VH CDR3, содержащий, состоящий или преимущественно состоящий из аминокислотной последовательности SGTVRGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 3), в которой

X₁ представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S;

X₂ представляет собой A или D;

X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) и содержит один, два или три гипервариабельных участка (CDR) вариабельной области легкой цепи (VL) антитела из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1). В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) и содержит один, два или три CDR вариабельной области тяжелой цепи (VH) любого из антител из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2).

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) и содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую одну, две или все три VL CDR антитела из табл. 1 (например, VL CDR из одного ряда в табл. 1). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, описанные в данном документе. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL (FR), приведенные в табл. 3 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 3).

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) и содержит вариабельную область легкой цепи (VH), содержащую один, два или все три VH CDR антитела из табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VH, описанные в данном документе. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VH (FR), приведенные в табл. 4 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 4).

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) и содержит CDR вариабельной области легкой цепи (VL) CDR вариабельной области тяжелой цепи (VH) любого из антител Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161, например, приведенные в табл. 1 и 2 (например, VH CDR и VL CDR из одного ряда принадлежат одному антителу, чье название указано в первой колонке табл. 1 и 2, например VL CDR и VH CDR в первом ряду табл. 1 и 2, соответственно, принадлежат антителу 231-32-15). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит описанные в данном документе каркасные области VL и каркасные области VH. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области (FR) VL и каркасные области VH, приведенные в табл. 3 и 4 (например, VL FR и VH FR принадлежат одному антителу).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, приведенные в табл. 1, например VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 любого из антител Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, VL CDR из одного ряда табл. 1). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL антитела, приведенного в табл. 3 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 3). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность переменной области легкой цепи, содержащую одну, две, три или четыре каркасные области последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности переменной области легкой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности переменной области легкой цепи, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 400-518. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности переменной области легкой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 519. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область переменной области легкой цепи, которая является или получена из аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим геном, при этом аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 607) и IGKV3-7*02 (SEQ ID NO: 608). В конкретных вариантах реализации изобретения каркасная область переменной области легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности за исключением наличия до 10 аминокислотных замен, делеций и/или вставок, предпочтительно до 10 аминокислотных замен. В конкретном варианте реализации изобретения каркасная область переменной области легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с заменой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков на аминокислоту, находящуюся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области переменной области легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область переменной области легкой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 607 или SEQ ID NO: 608, при этом по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 607 или SEQ ID NO: 608 замещена аминокислотой, находящейся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области переменной области легкой цепи. В конкретном варианте реализации изобретения аминокислотная замена находится в аминокислотной позиции 87, при этом аминокислотная позиция указана в соответствии с нумерацией Кабата. В конкретных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена представляет собой 87H, при этом аминокислотная позиция указана в соответствии с нумерацией Кабата.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из Hum231#1, например VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из Hum231#1, приведенные в табл. 1 (SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из подсемейства человеческих переменных областей каппа легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL антитела, приведенного в табл. 3 (например, каркасные области Hum231#1).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из Hum231#2, например VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из Hum231#2, приведенные в табл. 1 (SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из подсемейства человеческих переменных областей каппа легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL антитела, приведенного в табл. 3

(например, каркасные области pab1983).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из pab2159, например VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из pab2159, приведенные в табл. 1 (SEQ ID NO: 102, 105 и 109 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из подсемейства человеческих переменных областей каппа легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL антитела, приведенного в табл. 3 (например, каркасные области pab2159). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из pab2160, например VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из pab2160, приведенные в табл. 1 (SEQ ID NO: 102, 105 и 107 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из подсемейства человеческих переменных областей каппа легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL антитела, приведенного в табл. 3 (например, каркасные области pab2160).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из pab2161, например VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из pab2161, приведенные в табл. 1 (SEQ ID NO: 103, 105 и 109 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из подсемейства человеческих переменных областей каппа легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL антитела, приведенного в табл. 3 (например, каркасные области pab2161).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, приведенные в табл. 2, например, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, VH CDR из одного ряда табл. 2). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VH антитела, приведенного в табл. 4 (например, одну, две, три или четыре каркасные области из одного ряда в табл. 4). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или все четыре каркасные области последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 203. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности переменной области тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 215-389. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область переменной области тяжелой цепи, которая является или получена из аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим геном, при этом аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 601), IGHV1-3*01 (SEQ ID NO: 602), IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 603), IGHV1-18*01 (SEQ ID NO: 604), IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 605) и IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 606). В конкретных вариантах реализации изобретения каркасная область переменной области тяжелой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с заменой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков на аминокислоту, находящуюся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из Hum231#2, например, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из Hum231#2, приведенные в табл. 2 (SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из VH антитела человека или примата. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из подсемейства человеческих переменных областей тяжелой цепи (например, одного из подсемейств 1-7). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VH антитела, приведенного в табл. 4 (например, каркасные области Hum231#2). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из rab1964, например, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из rab1964, приведенные в табл. 2 (SEQ ID NO: 19, 24 и 34 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из подсемейства человеческих переменных областей тяжелой цепи (например, одного из подсемейств 1-7). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VH антитела, приведенного в табл. 4 (например, каркасные области rab1964).

- 74 -

- 76 -

денного в табл. 4 (например, каркасные области pab2161). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, приведенные в табл. 2, например, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161, (например, VH CDR из одного ряда табл. 2), и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, приведенные в табл. 1, например VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, VL CDR из одного ряда табл. 1). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL и каркасные области VH антитела, приведенного в табл. 3 и 4 соответственно (например, каркасные области одного антитела, название которого указано, например, все FR принадлежат Hum231#1 или Hum231#2). В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 215-389. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область вариабельной области тяжелой цепи, которая является или получена из аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим геном, при этом аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 601), IGHV1-3*01 (SEQ ID NO: 602), IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 603), IGHV1-18*01 (SEQ ID NO: 604), IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 605) и IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 606). В конкретных вариантах реализации изобретения каркасная область вариабельной области тяжелой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности за исключением наличия до 10 аминокислотных замен, делеций и/или вставок, предпочтительно до 10 аминокислотных замен. В конкретном варианте реализации изобретения каркасная область вариабельной области тяжелой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с заменой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков на аминокислоту, находящуюся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариабельной области тяжелой цепи. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область вариабельной области тяжелой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 601, при этом по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 601 замещена аминокислотой, находящейся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариабельной области тяжелой цепи. В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена находится в аминокислотной позиции, выбранной из группы, состоящей из 24, 48, 67, 71, 73 и 94, при этом аминокислотная позиция каждого представителя группы указана в соответствии с нумерацией Кабата. В конкретных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 24G, 48I, 67A, 71V, 73K и 94K, при этом аминокислотная позиция каждого представителя группы указана в соответствии с нумерацией Кабата. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL антитела, приведенного в табл. 3. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариабельной области легкой цепи, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 400-518. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 519. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область вариабельной области легкой цепи, которая является или получена из аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим геном, при этом ами-

ноктислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 607) и IGKV3-7*02 (SEQ ID NO: 608). В конкретных вариантах реализации изобретения каркасная область вариабельной области легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности за исключением наличия до 10 аминокислотных замен, делеций и/или вставок, предпочтительно до 10 аминокислотных замен. В конкретном варианте реализации изобретения каркасная область вариабельной области легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с заменой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков на аминокислоту, находящуюся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антители или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область вариабельной области легкой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 607 или SEQ ID NO: 608, при этом по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 607 или SEQ ID NO: 608 замещена аминокислотой, находящейся в аналогичной позиции в соответствующей нечеловеческой каркасной области вариабельной области легкой цепи. В конкретном варианте реализации изобретения аминокислотная замена находится в аминокислотной позиции 87, при этом аминокислотная позиция указана в соответствии с нумерацией Кабата. В конкретных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена представляет собой 87Н, при этом аминокислотная позиция указана в соответствии с нумерацией Кабата. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антители или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческий GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из Hum231#1, например VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из Hum231#1, приведенные в табл. 1 и 2 (SEQ ID NO: 16, 17, 18, 13, 14 и 15 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антители или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антителя человека или примата, и одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из VH антителя человека или примата. В некоторых вариантах реализации изобретения антители или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL и каркасные области VH антителя, приведенные в табл. 3 и 4 соответственно (например, каркасные области Hum231#1). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антители или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из Hum231#2, например VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из Hum231#2, приведенные в табл. 1 и 2 (SEQ ID NO: 16, 17, 18, 13, 14 и 15 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антители или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антителя человека или примата и одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из VH антителя человека или примата. В некоторых вариантах реализации изобретения антители или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL и каркасные области VH антителя, приведенные в табл. 3 и 4 соответственно (например, каркасные области одного антителя, название которого указано, например, каркасные области Hum231#1 или Hum231#2).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антители или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из rab1964, например VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из rab1964, приведенные в табл. 1 и 2 (SEQ ID NO: 101, 105, 106, 19, 24 и 34 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антители или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антителя человека или примата и одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из VH антителя человека или примата. В некоторых вариантах реализации изобретения антители или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL и каркасные области VH антителя, приведенные в табл. 3 и 4 соответственно (например, каркасные области rab1964). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антители или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из rab1965, например VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из rab1965, приведенные в табл. 1 и 2 (SEQ ID NO: 102, 105, 107, 19, 25 и 34 соответственно). В определенных вариантах реализации изобретения антители или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антителя человека или примата и одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из VH антителя человека или примата. В некоторых вариантах реализации изобретения антители или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области VL и каркасные области VH антителя, приведенные в табл. 3 и 4 соответственно (например, каркасные области rab1965).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антители или его

- 81 -

[illegible]

- 83 -

- 85 -

- 86 -

- 87 -

варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен и VH-домен, при этом VL-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 444, а VH-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 345 (например, антитело pab1980). В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен и VH-домен, при этом VL-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 453, а VH-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 345 (например, антитело pab1981). В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен и VH-домен, при этом VL-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 440, а VH-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 249 (например, антитело pab1983). В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен и VH-домен, при этом VL-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 408, а VH-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 224 (например, антитело pab2159). В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен и VH-домен, при этом VL-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 423, а VH-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 237 (например, антитело pab2160). В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен и VH-домен, при этом VL-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 486, а VH-домен состоит или преимущественно состоит из SEQ ID NO: 315 (например, антитело pab2161).

В определенных аспектах описанное в данном документе антитело может быть описано только в отношении его VL-домена или только его VH-домена, или только его 3 VL CDR, или только его 3 VH CDR. См., например, Rader C et al. (1998) PNAS 95: 8910-8915, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки, описывающую гуманизацию мышиного анти- $\alpha\beta_3$ антитела путем определения комплементарной легкой цепи или тяжелой цепи, соответственно, из библиотеки человеческих легких цепей или тяжелых цепей, что приводит к получению гуманизированных вариантов антител с такой же или большей аффинностью по сравнению с аффинностью исходного антитела. Также см. Clackson T et al. (1991) Nature 352: 624-628, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки, описывающую способы получения антител, которые связывают специфический антиген, путем применения конкретного VL-домена (или VH-домена) и проведения скрининга библиотеки в отношении комплементарных вариабельных доменов. В результате скрининга было получено 14 новых партнеров для конкретного VH-домена и 13 новых партнеров для конкретного VL-домена, которые проявляли сильное связывание при проведении анализа ELISA. Также см. Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки, описывающую способы получения антител, которые связывают специфический антиген, путем применения конкретного VH-домена и проведения скрининга библиотеки (например, библиотеки человеческих VL) в отношении комплементарных VL-доменов; отобранные VL-домены в свою очередь можно использовать для отбора дополнительных комплементарных (например, человеческих) VH-доменов.

В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации Хотиа, которая основана на расположении структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al. (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et al. (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et al. (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; и патент США № 7709226). Как правило, в системе нумерации Кабата петля CDR-H1 по Хотиа занимает аминокислоты тяжелой цепи от 26 до 32, 33 или 34, петля CDR-H2 по Хотиа занимает аминокислоты тяжелой цепи от 52 до 56, а петля CDR-H3 по Хотиа занимает аминокислоты тяжелой цепи от 95 до 102, в то время как петля CDR-L1 по Хотиа занимает аминокислоты легкой цепи от 24 до 34, петля CDR-L2 по Хотиа занимает аминокислоты легкой цепи от 50 до 56, а петля CDR-L3 по Хотиа занимает аминокислоты легкой цепи от 89 до 97. Конец петли CDR-H1 по Хотиа при нумерации по системе нумерации Кабата может приходиться на H32 и H34 в зависимости от длины петли (это происходит потому, что в схеме нумерации Кабата на месте H35A и H35B находятся вставки; если не присутствует ни 35A ни 35B, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют 35A и 35B, петля заканчивается на 34). В определенных аспектах в данном документе предложены антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR) и содержат одну или более VL CDR по Хотиа VL любого из описанных в данном документе антител (например, любого из Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) и/или одну или более VH CDR по Хотиа VH любого из описанных в данном документе антител (например, любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или анти-

тел pab2159, pab2160 или pab2161). В определенных вариантах реализации изобретения антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR), содержат одну или более CDR, в которых CDR по Кабату и Хотиа имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR) и содержат комбинации CDR по Кабату и CDR по Хотиа. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложены антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR) и содержат CDR по Хотиа любого из описанных в данном документе антител (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161).

В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, описанной в Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 и Lefranc M-P et al. (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. В соответствии со схемой нумерации IMGT VH-CDR1 соответствует позициям от 26 до 35, VH-CDR2 соответствует позициям от 51 до 57, VH-CDR3 соответствует позициям от 93 до 102, VL-CDR1 соответствует позициям от 27 до 32, VL-CDR2 соответствует позициям от 50 до 52, а VL-CDR3 соответствует позициям от 89 до 97. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложены антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR) и содержат CDR любого из описанных в данном документе антител (например, любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161), которые определены по системе нумерации IMGT, например, как описано в Lefranc M-P (1999), выше, и Lefranc M-P et al. (1999), выше).

В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с MacCallum RM et al. (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745. Также см., например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains" в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложены антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR) и содержат CDR любого из описанных в данном документе антител (например, любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161), которые определены по методу MacCallum RM et al. В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, в основе которой лежат гипервариабельные области AbM, что является компромиссом между CDR по Кабату и структурными петлями по Хотиа, и которая используется в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (Oxford Molecular Group, Inc.). В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложены антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR) и содержат CDR любого из описанных в данном документе антител (например, любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161), которые определены по схеме нумерации AbM.

В конкретном варианте реализации изобретения позиции одной или более CDR в области VH (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или VL (например, CDR1, CDR2 или CDR3) описанного в данном документе антитела могут отличаться на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислотных позиций до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). Например, в одном варианте реализации изобретения позиции, определяющие CDR любого описанного в данном документе антитела (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161), могут отличаться вследствие сдвига N-концевой и/или C-концевой границы CDR на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислот по сравнению с позициями CDR любого из описанных в данном документе антител (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161, определенных, например, в табл. 1) до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). В другом варианте реализации изобретения длина одной или более CDR в области VH (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или VL (например, CDR1, CDR2 или CDR3) описанного в данном документе антитела может

варьироваться (например, быть больше или меньше на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%).

В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и/или VH CDR3 могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот короче, чем одна или более описанных в данном документе CDR (например, SEQ ID NO: 1-34, 101-109 или 114-189, или SEQ ID NO: 35 или 191-194), до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). В другом варианте реализации изобретения описанные в данном документе VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и/или VH CDR3 могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот длиннее, чем одна или более описанных в данном документе CDR (например, SEQ ID NO: 1-34, 101-109 или 114-189, или SEQ ID NO: 35 или 191-194) до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). В другом варианте реализации изобретения аминоконект описанных в данном документе VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и/или VH CDR3 может быть продлен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более описанными в данном документе CDR (например, SEQ ID NO: 1-34, 101-109 или 114-189, или SEQ ID NO: 35 или 191-194) до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). В другом варианте реализации изобретения карбокси-конец описанных в данном документе VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и/или VH CDR3 может быть продлен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более описанными в данном документе CDR (например, SEQ ID NO: 1-34, 101-109 или 114-189, или SEQ ID NO: 35 или 191-194) до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). В другом варианте реализации изобретения аминоконект описанных в данном документе VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и/или VH CDR3 может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более описанными в данном документе CDR (например, SEQ ID NO: 1-34, 101-109 или 114-189, или SEQ ID NO: 35 или 191-194) до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). В одном варианте реализации изобретения карбокси-конец описанных в данном документе VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2 и/или VH CDR3 может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более описанными в данном документе CDR (например, SEQ ID NO: 1-34, 101-109 или 114-189, или SEQ ID NO: 35 или 191-194) до тех пор, пока сохраняется иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR) (например, в значительной степени сохраняется, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%). Любой известный в данной области техники способ можно использовать, чтобы определить, сохраняется ли иммуноспецифическое связывание с GITR (например, человеческим GITR), например, анализ и условия связывания, описанные в разделе "примеры" (раздел 6) в данном документе.

В конкретном аспекте в данном документе предложено антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь антитела, например, отдельную легкую и тяжелую цепь. В отношении легкой цепи, в конкретном варианте реализации изобретения легкая цепь описанного в данном документе антитела представляет собой легкую цепь каппа. В другом конкретном варианте реализации изобретения легкая цепь описанного в данном документе антитела представляет собой легкую цепь ламбда. В другом конкретном варианте реализации изобретения легкая цепь описанного в данном документе антитела представляет собой человеческую легкую цепь каппа или человеческую легкую цепь ламбда. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с полипептидом GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь, причем аминокислотная последовательность VL-домена содержит любую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 или 400-518), а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой легкой цепи каппа. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с полипептидом GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь, причем аминокислотная последовательность VL-домена содержит любую опи-

санную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 519), а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой легкой цепи каппа. В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь, причем аминокислотная последовательность VL-домена может содержать любую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 или 400-518), а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой легкой цепи лямбда. В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь, причем аминокислотная последовательность VL-домена может содержать любую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 519), а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой легкой цепи лямбда. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь, причем аминокислотная последовательность VL-домена содержит (SEQ ID NO: 207 или 208), а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой легкой цепи каппа или легкой цепи лямбда. Неограничивающие примеры человеческих последовательностей константных областей были описаны в данной области техники, например, см. патент США № 5693780 и Kabat EA et al. (1991), выше. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 555, 556, 571-576 и 580. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 571-576. В отношении тяжелой цепи, в конкретном варианте реализации изобретения тяжелая цепь описанного в данном документе антитела может представлять собой тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В другом конкретном варианте реализации изобретения тяжелая цепь описанного в данном документе антитела может включать человеческую тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит тяжелую цепь, причем аминокислотная последовательность VH-домена может содержать любую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, любую из SEQ ID NO: 201, 203, 206 или 215-389), а константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой тяжелой цепи гамма (γ). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит тяжелую цепь, причем аминокислотная последовательность VH-домена содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 553, 554, 567-570 и 579, а константная область тяжелой цепи содержит описанную в данном документе или известную в данной области техники аминокислотную последовательность человеческой тяжелой цепи. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит тяжелую цепь, причем аминокислотная последовательность VH-домена содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 581 и 582, а константная область тяжелой цепи содержит описанную в данном документе или известную в данной области техники аминокислотную последовательность человеческой тяжелой цепи. Неограничивающие примеры человеческих последовательностей константных областей были описаны в данной области техники, например, см. патент США № 5693780 и Kabat EA et al. (1991), выше.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 553, 554, 567-570 и 579. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 581 и 582. В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 567-570. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен и VH-домен, содержащие любые описанные в данном документе аминокислотные последовательности, а константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекул иммуноглобулинов IgG, IgE, IgM, IgD, IgA

или IgY или молекул человеческих иммуноглобулинов IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY. В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит VL-домен и VH-домен, содержащие любые описанные в данном документе аминокислотные последовательности, а константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекул иммуноглобулинов IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекул иммуноглобулинов. В конкретном варианте реализации изобретения константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекул человеческих иммуноглобулинов IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекул иммуноглобулинов.

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит VL-домен и VH-домен, содержащие любые описанные в данном документе аминокислотные последовательности, а константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей человеческого IgG1 (например, аллотипы G1m3, G1m17,1 или G1m17,1,2) или человеческого IgG4. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит VL-домен и VH-домен, содержащие любые описанные в данном документе аминокислотные последовательности, а константные области содержат аминокислотные последовательности константной области человеческого IgG1 (аллотип G1m3). Неограничивающие примеры человеческих константных областей были описаны в данной области техники, например, см. Kabat EA et al. (1991), выше.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 555, 556, 571-576 и 580, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 553, 554, 567-570 и 579. В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 576, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 581 и 582. В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 555 или 556, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 554.

В определенных вариантах реализации изобретения в Fc-область описанного в данном документе антитела или его фрагмента (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG1), и/или шарнирную область с нумерацией в соответствии с системой нумерации Кабата (например, индекс EU у Кабата)) внесены одна, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как сывороточное время полужизни, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антитело-зависимая клеточная цитотоксичность.

В определенных вариантах реализации изобретения одну, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) вносят в шарнирную область Fc-области (домен CH1) так, что происходит изменение числа остатков цистеина в шарнирной области (например, повышение или снижение), как описано, например, в патенте США № 5677425. Число остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 можно изменять, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей, или изменения (например, повышения или снижения) стабильности антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения в Fc-область описанного в данном документе антитела или его фрагмента (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG1), и/или шарнирную область с нумерацией в соответствии с системой нумерации Кабата (например, индекс EU у Кабата)) внесены одна, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) для повышения или снижения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора (например, активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела или его фрагмента, которые снижают или повышают аффинность антитела в отношении Fc-рецептора, а также методы внесения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций в Fc-области антитела, которые можно проводить для изменения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора, описаны, например, в Smith P et al. (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США № 6737056 и Международных публикациях № WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В конкретном варианте реализации изобретения одна, две или более аминокислотных мутаций (т.е. замен, вставок или делеций) внесены в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирную область-Fc) для изменения (например, снижения

или повышения) времени полужизни антитела *in vivo*. См., например, Международные публикации № WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631; и патенты США № 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745 в отношении примеров мутаций, которые изменяют (например, снижают или повышают) время полужизни антитела *in vivo*. В некоторых вариантах реализации изобретения одна, две или более аминокислотных мутаций (т.е. замен, вставок или делеций) внесены в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирную область-Fc) для снижения времени полужизни антитела *in vivo*. В других вариантах реализации изобретения одна, две или более аминокислотных мутаций (т.е. замен, вставок или делеций) внесены в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирную область-Fc) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В конкретном варианте реализации изобретения антитела могут содержать одну или более аминокислотных мутаций (например, замен) во втором константном домене (CH2) (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или третьем константном домене (CH3) (остатки 341-447 человеческого IgG1) с нумерацией в соответствии с индексом EU у Кабата (Kabat EA et al. (1991), выше). В конкретном варианте реализации изобретения константная область IgG1 описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в позиции 252, замену серина (S) на треонин (T) в позиции 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в позиции 256, пронумерованные в соответствии с индексом EU у Кабата. См. патент США № 7658921, который включен в данный документ посредством ссылки. Было показано, что этот тип мутантного IgG, называемый "мутантом YTE", демонстрирует в четыре раза большее время полужизни по сравнению с версиями того же антитела дикого типа (см. Dall'Acqua WF et al. (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более аминокислотных замен аминокислотных остатков в позициях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных в соответствии с индексом EU у Кабата.

В дополнительном варианте реализации изобретения в Fc-область константного домена IgG внесены одна, две или более аминокислотных замен для изменения эффекторной(ых) функции(й) антитела. Например, одну, две или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, пронумерованных в соответствии с индексом EU у Кабата, можно заменить другим аминокислотным остатком так, чтобы антитело обладало измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, в отношении которого изменяется аффинности, может быть, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход в подробностях описан в патентах США № 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах реализации изобретения делеция или инактивация (при помощи точечных мутаций или других средств) константной области может снижать связывание Fc-рецептора находящегося в циркуляции антитела, тем самым снижая локализацию опухоли. См., например, патенты США № 5585097 и 8591886 в отношении описания мутаций, которые инактивируют или удаляют константный домен и тем самым снижают локализацию опухоли. В определенных вариантах реализации изобретения в Fc-область описанного в данном документе антитела могут быть внесены одна или более аминокислотных замен для удаления потенциальных участков гликозилирования в Fc-области, что может снижать связывание Fc-рецептора (см., например, Shields RL et al. (2001) J Biol Chem 276: 6591-604). В различных вариантах реализации изобретения в константную область описанного в данном документе антитела могут быть введены одна или более из следующих мутаций: замена N297A; замена N297Q; замена L235A и замена L237A; замена L234A и замена L235A; замена E233P; замена L234V; замена L235A; делеция C236; замена P238A; замена D265A; замена A327Q; или замена P329A, пронумерованные в соответствии с индексом EU у Кабата.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен IgG1 с аминокислотной заменой N297Q или N297A.

В определенных вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 в константной области описанного в данном документе антитела, пронумерованных в соответствии с индексом EU у Кабата, могут быть замещены другим аминокислотным остатком так, что антитело характеризуется измененным связыванием C1q и/или сниженной или отсутствующей комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.). В некоторых вариантах реализации изобретения один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных позиций от 231 до 238 в N-концевой области домена CH2 описанного в данном документе антитела изменены с целью изменения способности антитела фиксировать комплемент. Этот подход дополнительно описан в Международной публикации № WO 94/29351. В определенных вариантах реализации изобретения Fc-область описанного в данном документе антитела модифицирована для повышения способности антитела опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или повышения аффинности антитела в отношении Fcγ-рецептора путем мутирования одной или более аминокислот (например, внесения аминокислотных замен) в следующих позициях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280,

283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 и 439, пронумерованных в соответствии с индексом EU у Кабата.

Этот подход дополнительно описан в Международной публикации № WO 00/42072. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело содержит константную область антитела IgG4, а серин в аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, пронумерованный в соответствии с индексом EU у Кабата, замещен пролином.

Сообщалось, что антитела со сниженным содержанием фукозы обладают повышенной аффинностью в отношении Fc-рецепторов, таких как, например, FcγRIIIa. Соответственно, в определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты имеют сниженное содержание фукозы или не содержат фукозу. Такие антитела можно получать при помощи известных в данной области техники методов. Например, антитела можно экспрессировать в клетках с недостаточной или отсутствующей способностью к фукозилрованию. В конкретном примере для получения антител со сниженным содержанием фукозы можно использовать линии клеток с нокаутом обоих аллелей α1,6-фукозилтрансферазы. Система Potelligent® (Lonza) является примером системы, которую можно использовать для получения антител со сниженным содержанием фукозы. В альтернативном варианте антитела или антигенсвязывающие фрагменты со сниженным содержанием фукозы можно получить, например, путем: (i) культивирования клеток в условиях, которые предотвращают или снижают фукозилрование; (ii) посттрансляционного удаления фукозы (например, при помощи фермента фукозидазы); (iii) посттрансляционного добавления необходимого углевода, например, после рекомбинантной экспрессии негликозилированного гликопротеина; или (iv) очистки гликопротеина таким образом, чтобы отобрать антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые не являются фукозилрованными. См., например, Longmore GD & Schachter H (1982) *Carbohydr Res* 100: 365-92 и Imai-Nishiya H et al. (2007) *BMC Biotechnol.* 7: 84 в отношении способов получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов без содержания фукозы или со сниженным содержанием фукозы. В определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты имеют повышенную аффинность в отношении CD32B (также известного как FcγRIIB или FCGR2B), например, по сравнению с антителом с Fc-областью дикого типа, например, IgG1 Fc. В определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты имеют избирательную повышенную аффинность в отношении CD32B (FcγRIIB) по сравнению как с CD32A (FcγRIIA), так и с CD16 (FcγRIIIA). Изменения в последовательностях, которые приводят к повышенной аффинности в отношении CD32B, приведены, например, в Mito et al., *Protein Engineering, Design & Selection* 10: 589-598 (2013), Chu et al., *Molecular Immunology* 45: 3926-3933 (2008), и Strohl, *Current Opinion in Biology* 20: 685-691 (2009), каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую мутацию, выбранную из группы, состоящей из: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F, L328E, аргинина, вставленного за позицией 236, и их комбинации, пронумерованных в соответствии с индексом EU (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda (1991)). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую замены S267E и L328F. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую замены P238D и L328E. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую замену P238D и замену, выбранную из группы, состоящей из E233D, G237D, H268D, P271G, A330R и их комбинаций. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую замены P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую G236D и S267E. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую S239D и S267E. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую S267E и L328F. В некоторых вариантах реализа-

ции изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент с повышенной аффинностью в отношении CD32B содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG1, или ее фрагмент, содержащую аргинин, вставленный за позицией 236, и L328R.

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь и тяжелую цепь, причем (i) легкая цепь содержит VL-домен, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие аминокислотные последовательности любого из Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, перечисленных в табл. 1); (ii) тяжелая цепь содержит VH-домен, содержащий VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие аминокислотные последовательности любого из Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, перечисленных в табл. 2); (iii) легкая цепь дополнительно содержит константный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена человеческой легкой цепи каппа; и (iv) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1 (необязательно, IgG1 (аллотип Glm3)).

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь и тяжелую цепь, причем (i) легкая цепь содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность любого из антител Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161, (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 или 400-518, или SEQ ID NO: 519); (ii) тяжелая цепь содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность любого из антител Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161, (например, SEQ ID NO: 201, 203, 206 или 215-389); (iii) легкая цепь дополнительно содержит константный домен, содержащий аминокислотную последовательность константного домена человеческой легкой цепи каппа; и (iv) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1 (необязательно, IgG1 (аллотип Glm3)).

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь и тяжелую цепь, причем (i) легкая цепь содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 207 или 208); (ii) тяжелая цепь содержит VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 206); (iii) легкая цепь дополнительно содержит константный домен, содержащий аминокислотную последовательность константного домена человеческой легкой цепи каппа; и (iv) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1 (необязательно, IgG1 (аллотип Glm3)).

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь и тяжелую цепь, причем (i) легкая цепь содержит VL-домен, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие аминокислотные последовательности любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, перечисленных в табл. 1); (ii) тяжелая цепь содержит VH-домен, содержащий VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие аминокислотные последовательности любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, перечисленных в табл. 2); (iii) легкая цепь дополнительно содержит константный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена человеческого IgG4; и (iv) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи человеческого IgG4.

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит легкую цепь и тяжелую цепь, причем (i) легкая цепь содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#2, pab1964,

- 97 -

(а) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 581; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 576. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит (а) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 582; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 576.

В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит (а) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 553 с аминокислотной заменой N на A или Q в аминокислотной позиции 298; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 555, 556 и от 571 до 576. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит (а) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 553 с аминокислотной заменой N на A или Q в аминокислотной позиции 298; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 556. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенное в данном документе антитело, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит (а) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 553 с аминокислотной заменой N на A или Q в аминокислотной позиции 298; и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 555. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области VL (FR), имеющие аминокислотную последовательность, описанную в данном документе для любого из описанных антител, например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, см. табл. 3). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области VH (FR), имеющие аминокислотную последовательность, описанную в данном документе для любого из описанных антител, например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, см. табл. 4). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь FR одного из описанных в данном документе антител (например, Hum231#1 Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161). В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит каркасные области (например, каркасные области VL-домена и/или VH-домена) которые являются человеческими каркасными областями или получены из человеческих каркасных областей. Неограничивающие примеры человеческих каркасных областей описаны в данной области техники, например, см. Kabat EA et al. (1991) выше. В определенном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело содержит каркасные области (например, каркасные области VL-домена и/или VH-домена) которые являются каркасными областями примата (например, обезьяны) или получены из каркасных областей примата (например, обезьяны).

Например, CDR из антигенспецифических нечеловеческих антител, как правило, от грызунов (например, мыши или крысы), прививают в гомологичные человеческие или обезьяньи акцепторные каркасные области. В одном варианте реализации изобретения обезьяньи акцепторные каркасные области получены от обезьян Старого Света. В конкретном варианте реализации изобретения акцепторная каркасная область обезьяны старого света получена от *Pan troglodytes*, *Pan paniscus* или *Gorilla gorilla*. В конкретном варианте реализации изобретения обезьяньи акцепторные каркасные области получены от шимпанзе *Pan troglodytes*. В конкретном варианте реализации изобретения обезьяньи акцепторные каркасные области представляют собой акцепторные каркасные области обезьян Старого Света. В конкретном варианте реализации изобретения акцепторные каркасные области обезьян Старого Света получены от вида Масаса. В определенном варианте реализации изобретения обезьяньи акцепторные каркасные области получены от яванского макака Масаса *synomolgus*. Обезьяньи каркасные последовательности описаны в публикации заявки на патент США № US 2005/0208625.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит одну, две или более каркасных областей VL (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для любого из антител, приведенных в табл. 3, выше. В некоторых вариантах

реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит одну, две или более каркасных областей VH (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для любого из антител, приведенных в табл. 4, выше. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит одну, две или более каркасных областей VL, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для любого из антител, приведенных в табл. 3, выше, и одну, две или более каркасных областей VH, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для антител, приведенных в табл. 4, выше.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит каркасные области VL-домена, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-452, 454-464, 467-477, 481-486, 488-513 или 515-518, и/или каркасные области VH-домена, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 271-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360, 362-368, 380, 384 или 387. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит каркасные области VL-домена, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-464, 467-477, 481-486, 488-513 или 515-519, и/или каркасные области VH-домена, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 270-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360 или 362-368. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области VL-домена, имеющие аминокислотную последовательность любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107 (например, SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-452, 454-464, 467-477, 481-486, 488-513 или 515-518), с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более аминокислотными мутациями (например, аминокислотными заменами, такими как консервативные аминокислотные замены), и/или каркасные области VH-домена, имеющие аминокислотную последовательность любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107 (например, SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 271-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360, 362-368, 380, 384 или 387). В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области VL-домена, имеющие аминокислотную последовательность любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-464, 467-477, 481-486, 488-513 или 515-519), с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более аминокислотными мутациями (например, аминокислотными заменами, такими как консервативные аминокислотные замены), и/или каркасные области VH-домена, имеющие аминокислотную последовательность любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 270-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360 или 362-368). В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит одну, две, три или четыре каркасные области VH-домена, имеющие аминокислотную последовательность любого из описанных в данном документе антител, например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160, pab2161 (например, SEQ ID NO: 201, 203, 206 или 215-389), с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более аминокислотными мута-

[illegible]

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с каркасными областями VL, описанными в данном документе для Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, приведенных в табл. 3); и (ii) каркасные области VH (FR), обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с каркасными областями VH, описанными в данном документе для Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, приведенных в табл. 4).

Определение процента идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями) также можно проводить при помощи математического алгоритма. Конкретным, неограничивающим примером математического алгоритма, применяемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268, модифицированный как в Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST авторства Altschul SF et al. (1990) J Mol Biol 215: 403. Нуклеотидный поиск BLAST можно осуществлять с установленными параметрами нуклеотидной программы NBLAST, например, счет=100, длина кода=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описанным в данном документе. Белковый поиск BLAST можно осуществлять с установленными параметрами программы XBLAST, например, счет 50, длина кода=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковой молекуле, описанной в данном документе. Для получения в целях сравнения выравниваний с гэпами можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul SF et al. (1997) Nuc Acids Res 25: 3389-3402. В альтернативном варианте можно использовать PSI BLAST для проведения итерационного поиска, который выявляет дальнюю взаимосвязь между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать установленные по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, National Center for Biotechnology Information (NCBI) в сети, ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным, неограничивающим примером математического алгоритма, применяемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Этот алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При применении программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4.

Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить, используя методы, сходные с описанными выше с или без разрешения гэпов. При расчете процента идентичности учитываются, как правило, только точные совпадения. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью VL-домена любого из антител Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 или 400-518, или SEQ ID NO: 519). В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен, обладающий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью VL-домена любого из антител Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, Hum231#1, 231-32-15, или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161, (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 или 400-518, или SEQ ID NO: 519), причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR (например, VL CDR), которые идентичны CDR (например, VL CDR) антитела, приведенного в табл. 1 и/или табл. 2 (например, CDR идентичны CDR конкретного антитела, название которого приведено в табл. 1 и/или 2).

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен, содержащий каркасные области VL, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью каркасных областей, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 и 400-518. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VL-домен, содержащий каркасные области VL, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%,

204, 205, 207 и 208; и (ii) VH-домен, содержащий каркасные области VH, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью каркасных областей, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389. В конкретном варианте реализации изобретения антитело содержит VL CDR, которые идентичны VL CDR антитела, приведенного в табл. 3, и/или VH CDR, которые идентичны VH CDR антитела, приведенного в табл. 4.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью VH-домена, выбранной из группы SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VH-домен, обладающий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью VH-домена, выбранной из группы SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR (например, VL CDR), которые идентичны CDR (например, VL CDR) антитела, приведенного в табл. 1 и/или табл. 2 (например, CDR идентичны CDR конкретного антитела, название которого приведено в табл. 1 и/или 2).

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), содержит VH-домен, содержащий каркасные области VH, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью каркасных областей, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389. В конкретном варианте реализации изобретения антитело содержит VH CDR, которые идентичны VH CDR антитела, приведенного в табл. 2 (например, VH CDR из одного ряда в табл. 2).

В другом аспекте в данном документе предложены антитела, которые связывают тот же или перекрывающийся эпитоп GITR (например, эпитоп человеческого GITR), что и описанное в данном документе антитело (например, антитело Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антитела 1-107) или антитела pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w. В определенных вариантах реализации изобретения эпитоп антитела может быть определен при помощи, например, ЯМР-спектроскопии, кристаллографических исследований дифракции рентгеновских лучей, анализа ELISA, водородного/дейтериевого обмена совместно с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматомасс-спектрометрией с электрораспылением), матричного сканирующего анализа олигопептидов и/или картирования методом мутагенеза (например, картирования методом сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно проводить при помощи любых известных в данной области техники методов (например, Giegé R et al. (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Кристаллы антитела: антиген можно исследовать при помощи хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей, а доводку можно осуществлять при помощи программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, поставляемого Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) тома 114 и 115, eds Wyckoff HW et al.; заявку на патент США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al. (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования по картированию методом мутагенеза можно проводить при помощи любого метода, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M et al. (1995), выше, и Cunningham BC & Wells JA (1989), выше, в отношении описания методов мутагенеза, включая методы аланин-сканирующего мутагенеза. В конкретном варианте реализации изобретения эпитоп антитела или его антигенсвязывающего фрагмента определяют при помощи исследований методом аланин-сканирующего мутагенеза, как описано в разделе 6, ниже. Кроме того, антитела, которые распознают и связывают те же самые или перекрывающиеся эпитопы GITR (например, человеческого GITR), можно выявлять при помощи рутинных методов, таких как иммуноанализ, например, путем демонстрации способности антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью, т.е. проводя анализ конкурентного связывания. Анализ конкурентного связывания также можно использовать, чтобы определить, обладают ли два антитела сходной специфичностью связывания в отношении эпитопа. Конкурентное связывание можно определить в анализе, в котором исследуемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание стандартного антитела с общим антигеном, таким как GITR. Известно большое число анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммуноанализ (ЕΙΑ), конкурентный "сэндвич"-анализ (см. Stahl C et al. (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); твердофазный прямой анализ ЕΙΑ с биотином и авидином (см. Kirkland TN et al. (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой

"сэндвич"-анализ с мечением (см. Harlow E & Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой РИА с мечением с использованием метки I-125 (см. Morel GA et al. (1988) *Mol Immunol* 25(1): 7-15); твердофазный прямой анализ EIA с биотином и авидином (Cheung RC et al. (1990) *Virology* 176: 546-52); и прямой РИА с мечением. (Moldenhauer G et al. (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82). Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена (например, GITR, такого как человеческий GITR), связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими немеченый исследуемый иммуноглобулин и меченый стандартный иммуноглобулин. Конкурентное ингибирование можно измерить, определяя количество метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Обычно исследуемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно ингибирует специфическое связывание стандартного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% или более. Анализ конкурентного связывания можно проводить в большом количестве разных форматов, используя или меченый антиген или меченое антитело. В общепринятой версии этого анализа антиген иммобилизуют в 96-луночном планшете. Затем определяют способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном, используя радиоактивные или ферментные метки. Дополнительные подробности см., например, в, Wagener C et al. (1983) *J Immunol* 130: 2308-2315; Wagener C et al. (1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274; Kuroki M et al. (1990) *Cancer Res* 50: 4872-4879; Kuroki M et al. (1992) *Immunol Invest* 21: 523-538; Kuroki M et al. (1992) *Hybridoma* 11: 391-407 и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow E & Lane D editors, выше, pp. 386-389.

В одном варианте реализации изобретения конкурентный анализ проводят методом поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), например, методом "тандемного подхода", описанного в Abdiche YN et al. (2009) *Analytical Biochem* 386: 172-180, в котором антиген GITR иммобилизуют на поверхности чипа, например, сенсорного чипа CM5, а затем через чип проводят анти-GITR антитела. Чтобы определить, конкурирует ли антитело с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, сначала через поверхность чипа проводят анти-GITR для достижения насыщения, а затем добавляют потенциально конкурирующее антитело. После этого можно определить и количественно оценить связывание конкурирующего антитела относительно неконкурирующего контроля.

В определенных аспектах анализ конкурентного связывания можно использовать для определения, происходит ли конкурентное блокирование антитела, например, дозозависимым образом, со стороны другого антитела, например, антитело связывает преимущественно тот же эпитоп или перекрывающиеся эпитопы, что и стандартное антитело, если два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы при проведении анализа конкурентного связывания, такого как конкурентный анализ ELISA, который можно проводить в любом из многочисленных форматов, используя или меченый антиген или меченое антитело. В конкретном варианте реализации изобретения антитело может быть исследовано в анализе конкурентного связывания с описанным в данном документе антителом (например, антителом Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антителами 1-107, или антителами pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w) или химерным антителом или антителом Fab, или антителом, содержащим VH CDR и VL CDR описанного в данном документе антитела (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w).

В другом аспекте в данном документе предложены антитела, которые конкурируют (например, дозозависимым образом) за связывание с GITR (например, человеческим GITR) с описанным в данном документе антителом (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антителами 1-107) или антителами pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w согласно определению при помощи анализа, известного специалисту в данной области техники или описанного в данном документе (например, конкурентного анализа ELISA или поверхностного плазмонного резонанса). В другом аспекте в данном документе предложены антитела, которые конкурентно ингибируют связывание (например, дозозависимым образом) описанного в данном документе антитела (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антитела 1-107, или антитела pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w) с GITR (например, человеческим GITR) согласно определению при помощи анализа, известного специалисту в данной области техники или описанного в данном документе (например, конкурентного анализа ELISA или суспензионного матричного анализа, или поверхностного плазмонного резонанса, описанных в примере 6, ниже). В конкретных вариантах реализации изобретения такое конкурентно блокирующее антитело активирует, индуцирует или повышает один или более видов активности GITR. В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело, которое конкурирует (например, дозозависимым образом) за специфическое связывание с GITR (например, человеческим GITR), с антителом, содержащим описанные в данном документе аминокислотные последовательности (например, аминокислотные последовательности VL и/или

VH антитела Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 или Hum231#2w), согласно определению при помощи анализа, известного специалисту в данной области техники или описанного в данном документе (например, конкурентного анализа ELISA или суспензионного матричного анализа, или поверхностного плазмонного резонанса, описанных в примере 6, ниже).

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено антитело, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) в той же степени, в какой антитело, описанное в данном документе, конкурирует само с собой за связывание с GITR (например, человеческим GITR). В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе предложено первое антитело, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR), при этом первое антитело конкурирует за связывание в анализе, включающем следующие этапы: (a) инкубацию в контейнере GITR-трансфицированных клеток первым антителом или в меченой форме; и (b) добавление в контейнер описанного в данном документе антитела в меченой форме и инкубацию клеток в контейнере; и (c) выявление связывания описанного в данном документе антитела в меченой форме с клетками. В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложено первое антитело, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR), при этом конкурентное проявление проявляется как снижение связывания первого антитела с GITR более чем на 80% (например, 85, 90, 95 или 98%, или от 80 до 85%, от 80 до 90%, от 85 до 90% или от 85 до 95%).

В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело, которое конкурирует (например, дозозависимым образом) за специфическое связывание с GITR (например, человеческим GITR), с антителом, содержащим VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-452, 454-464, 467-477, 481-486, 488-513 и 515-518, и VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 271-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 350, 354-356, 358-360, 362-368, 380, 384 и 387. В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело, которое конкурирует (например, дозозависимым образом) за специфическое связывание с GITR (например, человеческим GITR), с антителом, содержащим VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-452, 454-464, 467-477, 481-486, 488-513 и 515-519, и VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 270-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360 и 362-368. В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело, которое конкурирует (например, дозозависимым образом) за специфическое связывание с GITR (например, человеческим GITR), с антителом, содержащим (i) VL-домен, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие аминокислотные последовательности VL CDR антитела, приведенного в табл. 1; и (ii) VH-домен, содержащий VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR антитела, приведенного в табл. 2 (например, VH CDR конкретного антитела, название которого указано в табл. 1, такого как 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2).

В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложено антитело, которое конкурирует (например, дозозависимым образом) за специфическое связывание с GITR (например, человеческим GITR), с антителом, содержащим VH и VL CDR 231-32-15 (SEQ ID NO: 201 и 202).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело представляет собой антитело, которое конкурентно блокируется (например, дозозависимым образом) антителом, содержащим VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-452, 454-464, 467-477, 481-486, 488-513 и 515-518, и VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 271-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360, 362-368, 380, 384 и 387, за специфическое связывание с GITR (например, человеческим GITR). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело представляет собой антитело, которое конкурентно блокируется (например, дозозависимым образом) антителом, содержащим VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-464, 467-477, 481-486, 488-513 и 515-519, и VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 270-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360 и 362-368, за

специфическое связывание с G1TR (например, человеческим G1TR).

В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело представляет собой антитело, которое конкурентно блокируется антителом, содержащим VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207 или 208, и VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, за специфическое связывание с G1TR (например, человеческим G1TR).

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело представляет собой антитело, которое конкурентно блокируется (например, дозозависимым образом) антителом, содержащим (i) VL-домен, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR антитела, приведенного в табл. 1 (например, VL CDR конкретного антитела, название которого указано в табл. 1); и (ii) VH-домен, содержащий VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR антитела, приведенного в табл. 2.

В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с тем же эпитопом, что и антитело (например, любое из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w), содержащее описанные в данном документе аминокислотные последовательности (см., например, табл. 1-4), в отношении специфического связывания с G1TR (например, человеческим G1TR). Чтобы определить, связываются ли два антитела с одним эпитопом, можно использовать известные специалисту в данной области техники или описанные в данном документе методы анализа (например, рентгеновскую кристаллографию, анализ ELISA и т.д.). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связывается с тем же эпитопом, что и антитело (например, любое из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107), содержащее VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-452, 454-464, 467-477, 481-486, 488-513 и 515-518, и VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 271-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360, 362-368, 380, 384 и 387). В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связывается с тем же эпитопом, что и антитело (например, любое из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w), содержащее VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202, 207, 208, 400-411, 413-416, 418-421, 423-448, 450-464, 467-477, 481-486, 488-513 и 515-519, и VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 206, 215, 217-234, 236-256, 258, 259, 261-265, 267, 268, 270-273, 276, 277, 280, 281, 283-285, 287, 288, 290, 291, 294, 296-299, 301, 304-306, 308, 313-316, 319, 320, 322-325, 327, 328, 333, 336, 338-340, 342, 343, 345, 350, 354-356, 358-360 и 362-368.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связывается с тем же эпитопом, который связывается антителом, содержащим VH-домен и VL-домен антитела Hum231#1 или Hum231#2 (SEQ ID NO: 206 и 207 или SEQ ID NO: 206 и 208 соответственно), или эпитопом, который перекрывает эпитоп антитела, содержащего VH-домен и VL-домен антитела Hum231#1 или Hum231#2 (SEQ ID NO: 206 и 207 или SEQ ID NO: 206 и 208 соответственно).

В другом конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее (i) VL-домен, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR антитела, приведенного в табл. 1 (например, VL CDR конкретного антитела, название которого указано в табл. 1); и (ii) VH-домен, содержащий VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR антитела, приведенного в табл. 2 (например, VH CDR конкретного антитела, название которого указано в табл. 2).

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с G1TR (например, человеческим G1TR) и конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) связывание антитела 231-32-15, Hum231#1, Hum231#2 или Hum231#2w с G1TR (например, человеческим G1TR), содержит переменную область легкой цепи (VL) и переменную область тяжелой цепи (VH), при этом (i) VL содержит:

(a) VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность KSSQX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇KX₈YLY₉, (SEQ ID NO: 4), где

X₁ представляет собой L, A, V, I, P, F или M,
 X₂ представляет собой L, A, V, I, P, F, M или S,
 X₃ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A,
 X₄ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A,
 X₅ представляет собой G, N, Q, S, T, C, W, Y или A,
 X₆ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A,
 X₇ представляет собой Q, G, N, S, T, C, W, Y или A,
 X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A,
 X₉ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или A; и/или

(b) VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность X₁ASTRX₂X₃ (SEQ ID NO: 5), где X₁ представляет собой W, G, N, Q, S, T, C, Y, F, H или A,

X₂ представляет собой E, D или A,

X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A; и/или

(c) VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность QX₁X₂YX₃X₄PYT (SEQ ID NO: 6),

где

X₁ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W или Y,

X₂ представляет собой D, E или Y,

X₃ представляет собой S, G, N, Q, T, C, W, Y или A,

X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H, L или A; и

(ii) VH содержит:

(a) VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 1), в которой

X₁ представляет собой D, E, G или A,

X₂ представляет собой A, V, L, I, P, F, M или Y,

X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F или H; и/или

(b) VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность X₁IX₂X₃X₄SGX₅X₆X₇YX₈QKFX₉X₁₀ (SEQ ID NO: 2), в которой

X₁ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T,

X₂ представляет собой R, K, H, Q или A,

X₃ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I или P,

X₄ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или A,

X₅ представляет собой D, E, G или A,

X₆ представляет собой V, A, L, I, P, F, M или T,

X₇ представляет собой T, G, N, Q, S, C, W, Y, V, I, P или A,

X₈ представляет собой N, G, Q, S, T, C, W, Y или A,

X₉ представляет собой K, R, H, Q или A,

X₁₀ представляет собой D, E, G или A; и/или

(c) VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SGTVRGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 3), в которой

X₁ представляет собой F, A, V, L, I, P, M, Y, W, H или S,

X₂ представляет собой A или D,

X₃ представляет собой Y, G, N, Q, S, T, C, W, F, H или V.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти тело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR) и конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) связывание антитела 231-32-15, Hum231#1, Hum231#2 или Hum231#2w с GITR (например, человеческим GITR), содержит переменную область легкой цепи (VL) и переменную область тяжелой цепи (VH), при этом

(i) VL содержит:

(a) VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность KSSQSLLNSX₁NQKNYLX₂ (SEQ ID NO: 10), в которой

X₁ представляет собой G или S,

X₂ представляет собой T или S; и/или

(b) VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO: 11); и/или

(c) VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность QNX₁YSX₂PYT (SEQ ID NO: 12), в которой

X₁ представляет собой D или E,

X₂ представляет собой Y, F или S, и

(ii) VH содержит:

(a) VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность X₁YX₂MX₃ (SEQ ID NO: 7), в которой

X₁ представляет собой D, E или G,

X₂ представляет собой A или V,

X₃ представляет собой Y или H; и/или

(b) VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность X₁IX₂TX₃SGX₄X₅X₆YNQKFX₇X₈ (SEQ ID NO: 8), в которой

X₁ представляет собой V или L,

X₂ представляет собой R, K или Q,

X₃ представляет собой Y или F,

X₄ представляет собой D, E или G,

X₅ представляет собой V или L,

X₆ представляет собой T или S,

X₇ представляет собой K, R или Q,

X₈ представляет собой D, E или G; и/или

(c) VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SGTVRGFAY (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антитела 1-107, или антитела pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w), предотвращает связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GITR (например, человеческим GITR) менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе. В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, ингибирует связывание GITRL (например, человеческого GITRL) с GITR (например, человеческим GITR) менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% согласно оценке методом, описанным в примере 2, ниже (например, раздел 6.2.5.2 или 6.2.5.4, ниже). В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, в концентрации 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 333, 300, 250, 200, 100, 50 или 10 нг/мл ингибирует связывание 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL (например, GITRL-PE) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Luminex®) в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% по сравнению со связыванием 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 9 пг/мл, 8 пг/мл, 7 пг/мл, 6 пг/мл, 5 пг/мл, 4 или 3 пг/мл на гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Luminex® 200). В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, в концентрации от 1000 до 750 нг/мл, от 1000 до 500 нг/мл, от 850 до 500 нг/мл, от 750 до 500 нг/мл, от 600 до 500 нг/мл, от 500 до 400 нг/мл, от 400 до 300 нг/мл или от 300 до 200 нг/мл ингибирует связывание 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL (например, GITRL-PE) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Luminex®) в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20% или 10% по сравнению со связыванием 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Luminex® 200). В другом конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, в концентрации 3500, 3400, 3300, 3200, 3100, 3000, 2900, 2800, 2700, 2600, 2500, 2400, 2300, 2200, 2100, 2000, 1900, 1800, 1700, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200 или 1100 нг/мл ингибирует связывание 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL (например, GITRL-PE) со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Luminex®) в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу менее чем на 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 10% по сравнению со связыванием 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Luminex®

- 109 -

пг/мл на гранулу, по сравнению со связыванием 0,5 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 5 пг/мл/гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Lumindex® 200).

В другом варианте реализации изобретения определенное количество меченого GITRL (например, человеческого GITRL-PE) связывается со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Lumindex®) в присутствии антитела, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR или связывает тот же или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, в способе, включающем: (а) связывание GITR (например, человеческого GITR) с гранулами (например, человеческий GITR, связанный с гранулами Lumindex®) в концентрации 5 пг/мл на гранулу; (b) инкубацию в лунке связанных с GITR гранул в концентрации 40 гранул/мкл с 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 50 или 10 нг/мл конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, в течение первого периода времени (например, 30, 60 мин, 1,5 ч, 2, 2,5 или 3 ч), при этом лунка содержит 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 гранул; (с) добавление в лунку меченого GITRL (например, человеческого GITRL-PE) для получения конечной концентрации 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ (в конкретных вариантах реализации изобретения 0,5 нМ) меченого GITRL и 20 гранул/мкл связанного с гранулами GITR, и инкубацию в течение второго периода времени (например, 30 мин, 1 ч, 1,5, 2, 2,5 или 3 ч); и (d) выявление меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами GITR, например, в суспензионном матричном анализе, таком как система Lumindex® 200. В конкретных вариантах реализации изобретения количество меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами GITR, в присутствии конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, определяют относительно количества меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами GITR, в отсутствие конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом. В определенных вариантах реализации изобретения отсутствие конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, означает отсутствие в лунке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах реализации изобретения отсутствие конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, означает, что в лунке присутствует изотипическое контрольное антитело, которое не связывается с GITR. В соответствии с этими вариантами реализации изобретения определенное количество меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами GITR, в присутствии конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, составляет в некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, или от 20 до 60%, от 30 до 50% или от 20 до 70% от количества меченого GITRL, связанного со связанным с гранулами GITR, в отсутствие конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом.

В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70% или 75% GITRL (например, человеческого GITRL) связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывается с тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом, что и описанное в данном документе антитело, согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе. В конкретном варианте реализации изобретения по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70% или 75% GITRL (например, человеческого GITRL) связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывается с тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом, что и описанное в данном документе антитело, согласно оценке методом, описанным в примере 2, ниже (например, Разделы 6.2.5.2 или 6.2.5.4, ниже). В другом конкретном варианте реализации изобретения по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70% или 75% 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL (например, меченого человеческого GITRL, такого как hGITRL-PE) связывается со связанным с гранулами GITR (например, человеческим GITR, связанным с гранулами Lumindex®) в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу в присутствии 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 333, 300, 250, 200, 100, 50 или 10 нг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывается с тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом, что и описанное в данном документе антитело, по сравнению со связыванием 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL с GITR, связанным с гранулами в концентрации 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 пг/мл на гранулу, в отсутствие анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в суспензионном матричном анализе (например, система Lumindex® 200). В другом конкретном варианте реализации изобретения по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75% 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ меченого GITRL

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с G1TR (например, человеческим G1TR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, связывается с G1TR (например, человеческим G1TR) с константой скорости ассоциации (k_{acc}), составляющей по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $3,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или по меньшей мере $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с G1TR (например, человеческим G1TR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, связывается с G1TR (например, человеческим G1TR) с k_{acc} от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $3,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, от $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В определенных вариантах реализации изобретения k_{acc} определяют, используя моновалентное антитело, такое как фрагмент Fab, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В других вариантах реализации изобретения k_{acc} определяют, используя бива-

лентное антитело, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В конкретном варианте реализации изобретения $k_{\text{асс}}$ определяют методом анализа, описанным в разделе 6, ниже.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, связывается с GITR (например, человеческим GITR) с K_d , составляющей менее 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 или 0,1 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, связывается с GITR (например, человеческим GITR) с K_d , составляющей около 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 или 0,1 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое конкурирует с описанным в данном документе антителом за связывание с GITR (например, человеческим GITR) или связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп, что и описанное в данном документе антитело, связывается с GITR (например, человеческим GITR) с K_d , составляющей от 7 до 4 нМ, от 7 до 5 нМ, от 6 до 4 нМ, от 5 до 3 нМ, от 5 до 1 нМ, от 5 до 0,5 нМ, от 4 до 3 нМ, от 4 до 2 нМ, от 4 до 1 нМ, от 4 до 0,5 нМ, от 3 до 2 нМ, от 3 до 1 нМ, от 3 до 0,5 нМ, от 2 до 1 нМ, от 2 до 0,5 нМ, от 3 до 0,1 нМ, от 2 до 0,1 нМ, от 1 до 0,1 нМ или от 0,5 до 0,1 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения K_d рассчитывают как отношение $k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$, а $k_{\text{асс}}$ и $k_{\text{дисс}}$ определяют, используя моновалентное антитело, такое как фрагмент Fab, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В других вариантах реализации изобретения K_d рассчитывают как отношение $k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$, а $k_{\text{асс}}$ и $k_{\text{дисс}}$ определяют, используя бивалентное антитело, такое как фрагмент Fab, а измерения проводят, например, при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса BIAcore®. В конкретном варианте реализации изобретения K_d рассчитывают как показано в примерах в разделе 6, ниже (например, пример 2).

В определенных вариантах реализации изобретения эпитоп описанного в данном документе антитела применяют в качестве иммуногена для получения антител. См., например, раздел 5.2, ниже, в отношении способов получения антител. В конкретных аспектах описанное антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), не ингибирует (например, дозозависимым образом) связывание мышинового антитела 6C8 с GITR (например, человеческим GITR) в анализе, известном специалисту в данной области техники или описанном в данном документе. См., например, патент США № 7812135 в отношении описания мышинового антитела 6C8. В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более мышинового антитела 6C8 связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии описанного антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), согласно оценке методом, известным специалисту в данной области техники или описанным в данном документе. В конкретном варианте реализации изобретения описанное антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), не ингибирует (например, дозозависимым образом) связывание мышинового антитела 6C8 с GITR (например, человеческим GITR) согласно оценке методом, описанным в примере 6, ниже. В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более мышинового антитела 6C8 связывается с GITR (например, человеческим GITR) в присутствии описанного антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), согласно оценке методом, описанным в примере 6, ниже.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе анти-GITR антитела могут быть мультиспецифическими антителами, например, биспецифическими антителами. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело представляет собой биспецифическое антитело, при этом антитело обладает специфичностью в отношении по меньшей мере двух разных, как правило, не перекрывающихся эпитопов. В конкретном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит одно плечо, содержащее описанное в данном документе антитело со специфичностью к GITR (например, человеческому GITR), и второе плечо, содержащее антитело со специфичностью к другому эпитопу на GITR (например, человеческом GITR) или эпитопу на другой молекуле, например, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 или OX40. Например, биспецифическое антитело может содержать одно плечо, содержащее описанное в данном документе антитело со специфичностью к GITR (например, человеческому GITR), и второе плечо, содержащее антитело со специфичностью к CTLA-4, такое как тремелимумаб (Pfizer), ипилимумаб (Yervoy®, Bristol-Meyers Squibb), антитело, которое связывает тот же эпитоп, что и тремелимумаб или перекрывающийся эпитоп, или антитело, которое связывает тот же эпитоп, что и ипилимумаб или перекрывающийся эпитоп.

В конкретных аспектах описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), действует как агонист.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает активность GITR (например, человеческого GITR) по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз согласно оценке методами, описанными в данном документе и/или известными специалисту в данной области техники, по сравнению с активностью GITR (например, человеческого GITR) в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR). В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает активность GITR (например, человеческого GITR) по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% согласно оценке методами, описанными в данном документе и/или известными специалисту в данной области техники, по сравнению с активностью GITR (например, человеческого GITR) в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR). Неограничивающие примеры активности GITR (например, человеческого GITR) могут включать клеточную пролиферацию, сигнализацию GITR (например, человеческого GITR), клеточную выживаемость и выработку цитокинов (например, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α , и ИФН- γ). В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует или повышает активность GITR (например, человеческого GITR) вместе с GITRL (например, человеческим GITRL). В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует, усиливает или повышает активность GITR (например, человеческого GITR) в отсутствие GITRL (например, человеческого GITRL). В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент индуцирует, усиливает или повышает активность GITR и не ингибирует (например, полностью не ингибирует или только частично ингибирует) связывание GITRL с GITR. В конкретных вариантах реализации изобретения повышение активности GITR оценивают, как описано в примерах, ниже.

В определенных аспектах описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует, усиливает или повышает клеточную пролиферацию клеток, которые экспрессируют GITR и которые отвечают на сигнализацию GITR (например, клеток, которые пролиферируют в ответ на стимуляцию GITR и сигнализацию GITR, таких как Т-клетки). Методы анализа клеточной пролиферации описаны в данной области техники, например, это анализ включения ^3H -тимидина, анализ включения BrdU или анализ CFSE, описанные в примере 3, и могут легко быть осуществлены специалистом в данной области техники. В конкретных вариантах реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺), которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются повышенной клеточной пролиферацией по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело). См. пример 3, ниже, который демонстрирует повышение пролиферации Т-клеток в присутствии описанного в данном документе антитела, которое иммуноспецифически связывается с GITR. В одном варианте реализации изобретения Т-клетки CD8⁺, которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются повышенной клеточной пролиферацией по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело). В другом варианте реализации изобретения Т-клетки CD4⁺, которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются повышенной клеточной пролиферацией по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело).

рующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело). В другом варианте реализации изобретения Т-клетки CD4⁺ и Т-клетки CD8⁺, которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются повышенной клеточной пролиферацией по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело). В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки, которые не стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются повышенной активностью GITR и/или повышенной активностью NF-κB по сравнению с Т-клетками в отсутствие описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR).

В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает клеточную пролиферацию (например, Т-клеток, таких как эффекторные Т-клетки CD4 и CD8) по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, такими как анализ включения ³H-тимидина, анализ включения BrdU или анализ CFSE, описанные в примере 3, ниже), по сравнению с активностью GITR (например, человеческого GITR) в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR). В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает клеточную пролиферацию (например, Т-клеток, таких как эффекторные Т-клетки CD4 и CD8) по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, такими как анализ включения ³H-тимидина, анализ включения BrdU или анализ CFSE, описанные в примере 3, ниже), по сравнению с активностью GITR (например, человеческого GITR) в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR).

В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺), которые стимулировали митогеном Т-клеток (например, анти-CD3 антителом или форболовым эфиром) в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются клеточной пролиферацией, повышенной по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток, согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, такими как анализ включения ³H-тимидина, анализ включения BrdU или анализ CFSE, описанные в примере 3, ниже). В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺), которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются клеточной пролиферацией, повышенной по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, такими как анализ включения ³H-тимидина, анализ включения BrdU или анализ CFSE, описанные в примере 3, ниже). В конкретном варианте реализации изобретения клеточную пролиферацию оценивают, как описано в примере 3, ниже. В определенных аспектах описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например,

человеческим GITR), повышает выживаемость клеток (например, Т-клеток, таких как эффекторные Т-клетки CD4 и CD8). В конкретном варианте реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4+ или CD8+), которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются повышенной выживаемостью по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток. Методы анализа клеточной выживаемости описаны в данной области техники (например, анализ вытеснения трипанового синего) и могут легко быть осуществлены специалистом в данной области техники. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает клеточную выживаемость (например, Т-клеток, таких как эффекторные Т-клетки CD4 и CD8) по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, анализ вытеснения трипанового синего), по сравнению с клеточной выживаемостью в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR). В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), повышает клеточную выживаемость (например, Т-клеток, таких как эффекторные Т-клетки CD4 и CD8) по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, анализ вытеснения трипанового синего), по сравнению с клеточной выживаемостью в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR).

В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4+ или CD8+), которые стимулировали митогеном Т-клеток (например, анти-CD3 антителом или форболовым эфиром), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются клеточной выживаемостью, повышенной по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, анализ вытеснения трипанового синего). В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4+ или CD8+), которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются клеточной выживаемостью, повышенной по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток, согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, анализ вытеснения трипанового синего).

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), защищает эффекторные Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4+ или CD8+) от индуцированной активацией клеточной гибели. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует устойчивость эффекторных Т-клеток (например, эффекторных Т-клеток CD4+ или CD8+) к Treg-опосредованной супрессии. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует, усиливает или повышает выработку цитокинов (например, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α и ИФН- γ) по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% согласно оценке методами, описанными в данном документе (см. примеры, ниже, такие как пример 3) или известными специалисту в данной области техники, по сравнению с выработкой цитокинов в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR). В конкретных вариантах реализации изобретения

описанное в данном документе антитело или его фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует или повышает выработку цитокинов (например, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α и ИФН- γ) по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз согласно оценке методами, описанными в данном документе (см. примеры, ниже, такие как пример 3) или известными специалисту в данной области техники, по сравнению с выработкой цитокинов в присутствии или отсутствии стимуляции GITRL (например, человеческого GITRL) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое иммуноспецифически не связывается с GITR).

В определенных вариантах реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺), которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются выработкой цитокинов (например, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α и ИФН- γ), повышенной по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, анализ ELISA или как описано в примерах, ниже). В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки (например, эффекторные Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺), которые стимулировали митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), в присутствии описанного в данном документе антитела или его фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), характеризуются выработкой цитокинов (например, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α и ИФН- γ), повышенной по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз по сравнению с Т-клетками, которые стимулировали только митогеном Т-клеток или агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело), согласно оценке методами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники (например, анализ ELISA или как описано в примерах, ниже). В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует, усиливает или активизирует активность GITR в отсутствие агониста РТК (например, анти-CD3 антитела). Активность GITR можно оценить, определяя активацию канонических и неканонических путей NF- κ B. Активность GITR можно оценить, определяя активацию сигнальных путей, опосредованных TRAF-адаптера. TRAF-адаптер выбран из группы, состоящей из TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4 и TRAF5. Активность GITR можно оценить, определяя активацию пути MAPK/ERK (также называемого путем Ras-Raf-MEK-ERK). Примеры "агониста РТК" включают, но не ограничиваются этим, антитела, нацеленные на комплекс рецепторов Т-клеток (например, анти-CD3 антитело), и пептиды, связанные с человеческими лейкоцитарными антигенами, например, ГКГС класса I и ГКГС класса II, причем пептиды получены из собственных, мутированных собственных или патоген-ассоциированных белков (например, вирусных или бактериальных).

Анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть слито или конъюгировано (например, ковалентно или нековалентно связано) с выявляемой меткой или веществом. Примеры выявляемых меток или веществ включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (¹²⁵I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹²¹In) и технеций (⁹⁹Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для выявления белка GITR (например, человеческого GITR). См., например, раздел 5.4.2, ниже.

5.2. Получение антител

Антитела или их фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с GITR (например, человеческим GITR) можно получать любым известным в данной области техники методом синтеза антител, например, методом химического синтеза или методами рекомбинантной экспрессии. В описанных в данном документе способах применяются, если не указано иное, традиционные методы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантных ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и связанных с данной областью техники областей. Эти методы описаны, например, в перечисленных в данном документе ссылках, и полностью разъяснены в литературе. См., например, Maniatis T et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al. (1989), *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B et al. (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело представляет собой антитело (например, рекомбинантное антитело), полученное, экспрессированное, созданное или выделенное любыми способами, которые включают создание, например, посредством синтеза, генетического конструирования последовательностей ДНК. В определенных вариантах реализации изобретения такое антитело содержит последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в репертуаре зародышевой линии антител животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

В определенном аспекте в данном документе предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), включающий культивирование описанной в данном документе клетки или клетки-хозяина. В определенном аспекте в данном документе предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента при помощи описанной в данном документе клетки или клетки-хозяина (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие описанное в данном документе антитело). В конкретном варианте реализации изобретения клетка является выделенной клеткой. В конкретном варианте реализации изобретения в клетку были внесены экзогенные полинуклеотиды. В конкретном варианте реализации изобретения способ дополнительно включает этап очистки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученного из клетки или клетки-хозяина.

Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, Главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, New York).

Моноклональные антитела можно получать при помощи большого количества способов, известных в данной области техники, включая применение гибридомы, рекомбинантные методы и метод фагового дисплея и их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получать, применяя технологии гибридом, включая те, которые известны в данной области техники и описаны, например, в Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). В контексте данного документа термин "моноклональное антитело" не ограничен антителами, полученными при помощи технологии гибридомы. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих описанное в данном документе антитело или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

В конкретных вариантах реализации изобретения в контексте данного документа "моноклональное антитело" представляет собой антитело, вырабатываемое одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, вырабатывающей рекомбинантное антитело), при этом антитело иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR) согласно определению, например, методом ELISA или другим методом анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области техники или приведенного в примерах в данном документе. В конкретных вариантах реализации изобретения моноклональное антитело может быть химерным антителом или гуманизированным антителом. В определенных вариантах реализации изобретения моноклональное антитело является моновалентным антителом или мультивалентным (например, бивалентным) антителом. В конкретных вариантах реализации изобретения моноклональное антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом). Описанные в данном документе моноклональные антитела могут, например, быть получены методом гибридомы, как описано в Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495, или могут, например, быть выделены из фаговых библиотек при помощи описанных в данном документе способов. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., выше).

Способы получения и проведения скрининга в отношении специфических антител при помощи технологии гибридомы являются рутинными и хорошо известны в данной области техники. Например, в методе гибридомы мышь или другое подходящее животное-хозяина, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макака, иммунизируют, чтобы получить лимфоциты, которые вырабатывают или способны вырабатывать антитела, которые специфически связываются с белком (например, GITR (например, человеческим GITR)), применяемым для иммунизации. В альтернативном варианте лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы при помощи подходящего сшиваю-

щего агента, такого как полиэтиленгликоль, для получения клетки гибридомы (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986)). Кроме того, для иммунизации животного можно использовать метод RIMMS (множественные сайты повторной иммунизации) (Kilpatrick KE et al. (1997) *Hybridoma* 16:381-9, в полном объеме включенная посредством ссылки).

В некоторых вариантах реализации изобретения мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) можно иммунизировать антигеном (например, GITR (например, человеческим GITR)), а после выявления иммунного ответа, например, выявления антител, специфических в отношении антигена, получать мышинные селезенки и выделять спленоциты. Затем при помощи хорошо известных методов спленоциты сливают с любыми подходящими клетками миеломы, например, клетками из клеточной линии SP20, доступными от Американской коллекции типовых культур (ATCC®) (Manassas, VA), для образования гибридом. Отбор и клонирование гибридом проводят методом предельного разведения. В определенных вариантах реализации изобретения получают лимфатические узлы иммунизированных мышей, клетки которых сливают с клетками миеломы NS0.

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неслитых родительских клеток миеломы. Например, если в родительских клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ или ГГФТ), культуральная среда для гибридом, как правило, содержит гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые препятствуют росту клеток с дефицитом ГГФРТ.

В конкретных вариантах реализации изобретения применяют клетки миеломы, которые подлежат эффективному слиянию, поддерживают стабильную выработку на высоком уровне антитела отобранными вырабатывающими антитело клетками и являются чувствительными к средам, таким как среда HAT. Среди этих клеточных линий миеломы есть линии мышинной миеломы, такие как линия клеток NS0, или полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные от Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные от Американской коллекции типовых культур, Rockville, MD, USA. Также были описаны линии клеток человеческой миеломы и мышино-человеческой гетеромиеломы для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, оценивают в отношении выработки моноклональных антител, направленных против GITR (например, человеческого GITR). Специфичность связывания моноклональных антител, вырабатываемых клетками гибридомы, определяют известными в данной области техники способами, например, методом иммунопреципитации или методом анализа *in vitro* связывания, таким как радиоиммуноанализ (РИА) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

После выявления клеток гибридомы, которые вырабатывают антитела с желаемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, можно субклонировать клоны при помощи процедур предельного разведения и выращивать стандартными методами (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, выше). Подходящие для этой цели культуральные среды включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами удобно отделять от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки при помощи традиционных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, хроматография с протеином А-сефарозой, гидроксилапатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. Описанные в данном документе антитела включают фрагменты антител, которые распознают специфический GITR (например, человеческий GITR) и могут быть получены любым методом, известным специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном документе фрагменты Fab и F(ab')₂ можно получать путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина при помощи ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь, спаренную с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирной области.

Кроме того, описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также можно получать, используя различные методы фагового дисплея, известные в данной области техники. В методах фагового дисплея функциональные домены антител представляются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие VH- и VL-домены, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек человеческой или мышинной кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующие VH- и VL-домены, рекомбинируют вместе с линкером scFv посредством ПНР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор электропорировать в *E.coli*, а *E.coli* инфицируют хелперным фагом. Фаг, используемый в этих методах, как правило, представляет собой нитевидный фаг, включая fd и M13, а VH- и VL-домены обыч-

но рекомбинантно сливают с геном III или геном VIII фага. Отбор или определение фага, экспрессирующего антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, можно проводить при помощи антигена, например, используя меченый антиген или антиген, связанный или иммобилизованный на твердой поверхности или грануле. Примеры методов фагового дисплея, которые можно применять для получения описанных в данном документе антител, включают описанные в Brinkman U et al. (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS et al. (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA et al. (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L et al. (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; заявке согласно PCT № PCT/GB91/001134; Международных публикациях № WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патентах США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

Как описано в вышеприведенных ссылках, после фагового отбора антитело-кодирующие области фага можно выделять и использовать для получения целых антител, включая человеческие антитела, или любого другого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессировать в любом необходимом организме-хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как описано ниже. Методы для рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂, также можно применять, используя известные в данной области техники методы, такие как раскрытые в публикации согласно PCT № WO 92/22324; Mullinax RL et al. (1992) *Bio-Techniques* 12(6): 864-9; Sawai H et al. (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; и Better M et al. (1988) *Science* 240: 1041-1043. В одном аспекте для получения целых антител можно использовать ПЦР-праймеры, включая нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции для амплификации последовательностей VH или VL с матрицы, например, клонов scFv. Используя известные специалистам в данной области техники методы клонирования, ПЦР-амплифицированные VH-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VH, а ПЦР-амплифицированные VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VL, например, человеческие каппа или лямбда константные области. VH- и VL-домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем, используя известные специалистам в данной области техники методы, конверсионные векторы тяжелой цепи и конверсионные векторы легкой цепи котрансфицируют в клеточные линии для получения стабильных или временных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG.

Химерное антитело - это молекула, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать вариабельную область мышинового или крысиного моноклонального антитела, слитую с константной областью человеческого антитела. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD et al. (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; и патенты США № 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415. Гуманизированное антитело способно связываться с заданным антигеном и содержит каркасную область, имеющую главным образом аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющие главным образом аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, мышинового иммуноглобулина). В конкретных вариантах реализации изобретения гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Антитело также может содержать CH1, шарнирную, CH2, CH3 и CH4 области тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Гуманизированные антитела можно получать при помощи большого количества методов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, прививание CDR (Европейский патент № 239400; Международная публикация № WO 91/09967; и патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089), ввинчивание или изменение поверхности (Европейские патенты № EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM et al. (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; и Roguska MA et al. (1994) *PNAS* 91: 969-973), перетасовку цепей (патент США № 5565332) и методы, раскрытые, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, Международной публикации № WO 93/17105; Tan P et al. (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C et al. (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V et al. (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M et al. (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA et al. (1996) *Protein Eng* 9(10): 895 904; Couto JR et al. (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR et al. (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 и Pedersen JT et al. (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73. Также см. публикацию заявки на патент США № US 2005/0042664 A1 (Feb. 24, 2005), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Способы получения мультиспецифических (например, биспецифических) антител были описаны, например, в патентах США № 7951917; 7183076; 8227577; 5837242; 5989830; 5869620; 6132992 и 8586713.

Однодоменные антитела, например, антитела, в которых отсутствуют легкие цепи, можно получать хорошо известными в данной области техники способами. См. Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J*

Immunol 231: 25-38; Nuttall SD et al. (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4): 277-302; патент США № 6005079; и Международные публикации № WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301.

Кроме того, антитела, которые мультиспецифически связываются с антигеном GITR, можно, в свою очередь, использовать для получения антител, которые "имитируют" антиген, используя методы, хорошо известные специалистам в данной области техники. (См., например, Greenspan NS & Bona CA (1989) *FASEB J* 7(5): 437-444; и Nissinoff A (1991) *J Immunol* 147(8): 2429-2438).

В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое связывается с тем же эпитопом GITR (например, человеческого GITR), что и описанное в данном документе анти-GITR антитело, является человеческим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) связывание любого из описанных в данном документе антител (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w) с GITR (например, человеческим GITR), является человеческим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Человеческие антитела можно получать любым известным в данной области техники способом. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены человеческих иммуноглобулинов. В частности, в мышинные эмбриональные стволовые клетки можно случайным образом или посредством гомологичной рекомбинации вносить генные комплексы человеческих тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. В альтернативном варианте кроме генов человеческой тяжелой и легкой цепи в мышинные эмбриональные стволовые клетки можно вносить человеческие вариабельную область, константную область и D-область. Мышинные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина можно сделать нефункциональными отдельно или одновременно с внесением локусов человеческого иммуноглобулина посредством гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготное удаление J_H-области препятствует выработке эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и микроинъектируют в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем химерных мышей скрещивают для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует человеческие антитела. Трансгенных мышей обычным образом иммунизируют отобранным антигеном, например, всем или частью антигена (например, GITR). Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получать от иммунизированных, трансгенных мышей при помощи традиционной технологии гибридомы. Трансгены человеческого иммуноглобулина, которые несут трансгенные мыши, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и впоследствии претерпевают переключение класса и соматическую мутацию. Таким образом, используя этот метод, можно получать терапевтически применимые антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор этой технологии получения человеческих антител см. в Lonberg N & Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93. Подробное обсуждение этой технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител, а также протоколов для получения таких антител, см., например, в Международных публикациях № WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735; и патентах США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598. Примеры мышей, способных вырабатывать человеческие антитела, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США № 6075181 и 6150184), HuAb-Mouse™ (Mederex, Inc./Gen Pharm; патенты США № 5545806 и 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

Человеческие антитела, которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR), можно получать большим количеством известных в данной области техники методов, включая описанные выше методы фагового дисплея, использующие библиотеки антител, полученные из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Также см. патенты США № 4444887, 4716111 и 5885793; и Международные публикации № WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В некоторых вариантах реализации изобретения человеческие антитела можно получать при помощи мышино-человеческих гибридом. Например, лимфоциты человеческой периферической крови, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), можно сливать с клетками мышинной миеломы для получения мышино-человеческих гибридом, секретирующих человеческие моноклональные антитела, и проводить скрининг этих мышино-человеческих гибридом, чтобы определить те, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, которые иммуноспецифически связываются с антигеном-мишенью (например, GITR (например, человеческим GITR)). Такие методы известны и описаны в данной области техники, см., например, Shinmoto H et al. (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y et al. (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31.

5.2.1. Полинуклеотиды

В определенных аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи), которое иммуноспецифически связывается с антигеном GITR (например, человеческим GITR), и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, клетках *E. coli* и млекопитающих). В данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие любое из предложенных в данном документе антител, а также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, экспрессионные векторы для эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

В контексте данного документа "выделенные" полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты являются такими, которые отделены от других молекул нуклеиновых кислот, которые присутствуют в естественном источнике (например, в организме мыши или человека) молекул нуклеиновых кислот. Кроме того, "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может быть в значительной степени свободной от другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методами или в значительной степени свободной от химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Например, выражение "в значительной степени свободные" включает препараты полинуклеотидов или молекул нуклеиновых кислот, содержащие менее чем около 15, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (в частности, менее чем около 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химических веществ. В конкретном варианте реализации изобретения молекула(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(от), кодирующая описанное в данном документе антитело, является выделенной или очищенной.

В конкретных аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с полипептидом GITR (например, человеческим GITR) и содержат описанные в данном документе аминокислотные последовательности, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом GITR (например, дозозависимым образом) или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела. В определенных аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь описанного в данном документе антитела. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую VL FR и CDR описанных в данном документе антител (см., например, табл. 1 и 3). Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую VH FR и CDR описанных в данном документе антител (см., например, табл. 2 и 4). В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 и 400-518. В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 519. В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389. В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность любого из антител 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 202, 207 или 208). В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность любого из антител 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 201 или 206). В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VL-домен и VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность любого из антител 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 201-202 и/или 206-208).

В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-GITR антитело, содержащее три CDR VL-цепи, например, содержащее VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 любого из описанных в данном документе антител (например, см. табл. 1, например VL CDR из одного ряда в табл. 1). В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие три CDR VH-цепи, например, содержащие VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 любого из описанных в данном документе антител (например, см. табл. 2, например VH CDR из одного ряда в табл. 2). В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-GITR антитело, содержащее три CDR VL-цепи, например, содержащие VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 любого из описанных в данном документе антител (например, см. табл. 1, например VL CDR из одного ряда в табл. 1), и три CDR VH-цепи, например, со-

держащие VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 любого из описанных в данном документе антител (например, см. табл. 2, например, VH CDR из одного ряда в табл. 2). В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VL CDR любого из антител 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 16, 17 или 18). В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VH CDR любого из антител 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 13, 14 или 15). В конкретных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид кодирует VL CDR и VH CDR любого из антител 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 (например, SEQ ID NO: 13-18).

В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-GITR антитело, содержащее VL-домен, например, содержащий FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, содержащий описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, см. табл. 1 и 3, например VL CDR и VL FR конкретного антитела, название которого указано в табл.). В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-GITR антитело, содержащее VH-домен, например, содержащий FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, содержащий описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, см. табл. 2 и 4, например, VH CDR и VH FR конкретного антитела, название которого указано в табл.). В определенных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую предложенное в данном документе антитело, содержащее вариательную область легкой цепи, содержащую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 и 400-518 или SEQ ID NO: 519), при этом антитело иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR). В определенном варианте реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую предложенные в данном документе антитела Hum231#1 или Hum231#2, или Hum231#2w, содержащие вариательную область легкой цепи, содержащую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 207 или 208). В определенных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую предложенное в данном документе антитело, содержащее вариательную область тяжелой цепи, содержащую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389), при этом антитело иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR). В определенном варианте реализации изобретения описанный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую предложенные в данном документе антитела Hum231#1, Hum231#2 или Hum231#2w, содержащие вариательную область тяжелой цепи, содержащую описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 206).

В определенных аспектах полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело, содержащее VL-домен, содержащий одну или более VL FR, имеющих описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, см. табл. 3, например, каркасные области из одного ряда таблицы), при этом антитело иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR). В определенных аспектах полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело, содержащее VH-домен, содержащий одну или более VH FR, имеющих описанную в данном документе аминокислотную последовательность (например, см. табл. 4, например, каркасные области из одного ряда таблицы), при этом антитело иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR).

В конкретных вариантах реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело, содержащее каркасные области (например, каркасные области VL-домена и VH-домен), которые представляют собой человеческие каркасные области, при этом антитело иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR). В определенных вариантах реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент (например, CDR или вариательный домен), описанное в разделе 5.1, выше.

В конкретных аспектах в данном документе предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую, антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь например, отдельную легкую цепь и тяжелую цепь. В отношении легкой цепи в конкретном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь каппа. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ламбда. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело, содержащее человеческую легкую цепь каппа или человеческую легкую цепь ламбда. В конкретном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе анти-

тело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), причем анти-тело содержит легкую цепь, при этом аминокислотная последовательность VL-домена может содержать любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 и 400-518 или SEQ ID NO: 519), а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой легкой цепи каппа. В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе анти-тело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), и содержит легкую цепь, при этом аминокислотная последовательность VL-домена может содержать любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, SEQ ID NO: 202, 204, 205, 207, 208 и 400-518 или SEQ ID NO: 519), а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой легкой цепи лямбда. Например, последовательности человеческой константной области могут представлять описанные в патенте США № 5693780. В конкретном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе анти-тело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), причем анти-тело содержит тяжелую цепь, при этом аминокислотная последовательность VH-домена может содержать любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389), а константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области человеческой тяжелой цепи гамма (γ).

В определенном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-домен и/или VL-домен описанного в данном документе анти-тела (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или анти-тел 1-107, таких как SEQ ID NO: 209 или 800-974 для VH-домена или SEQ ID NO: 210, 211 или 1001-1126 для VL-домена), которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR). В определенном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-домен и/или VL-домен описанного в данном документе анти-тела (например, Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или анти-тел 1-107, или анти-тел pab2159, pab2160 или pab2161, таких как SEQ ID NO: 209 или 800-974 для VH-домена или SEQ ID NO: 210, 211 или 1000-1118 для VL-домена), которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR). В определенном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-домен и/или VL-домен анти-тела Hum231#1 или Hum231# (например, SEQ ID NO: 209-211). В другом конкретном варианте реализации изобретения предложенный в данном документе полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе анти-тело (или его антигенсвязывающий фрагмент), которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), причем анти-тело содержит VL-домен и VH-домен, содержащие описанные в данном документе аминокислотные последовательности, а константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей человеческого IgG1 (например, аллотип 1, 17 или 3) или человеческого IgG4.

В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-GITR анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент или домен, приведенные в данном документе, см., например, табл. 1-4, например, анти-тело Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или анти-тела 1-107, или анти-тела pab2159, pab2160, pab2161 или Hum231#2w.

Также в данном документе предложены полинуклеотиды, кодирующие анти-GITR анти-тело или его фрагмент, которые оптимизированы, например, посредством оптимизации кодон/ПНК, замещения гетерологичных сигнальных последовательностей и удаления элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих анти-GITR анти-тело или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, VH-домен или VL-домен), для рекомбинантной экспрессии путем внесения изменений в кодоны и/или удаления ингибиторных областей в мРНК можно осуществлять, адаптируя методы оптимизации, описанные, например, патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498 соответственно. Например, потенциальные участки сплайсинга и элементы нестабильности (например, A/T- или A/U-богатые элементы) в РНК можно мутировать без изменения аминокислот, кодируемых нуклеотидными последовательностями, для повышения стабильности РНК для рекомбинантной экспрессии. В изменениях используется вырожденность генетического кода, например, используется альтернативный кодон для идентичной аминокислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения может существовать необходимость изменения одного или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, аналогичной аминокислоты с аналогичной химической структурой

и свойствами и/или функцией, что и у исходной аминокислоты. Такие методы могут повысить экспрессию анти-GITR антитела или его фрагмента по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 раз или 100 раз или более по сравнению с экспрессией анти-GITR антитела, кодируемого полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

В определенных вариантах реализации изобретения оптимизированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая описанное в данном документе анти-GITR антитело или его фрагмент (например, VL-домен и/или VH-домен), может гибридизироваться с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей описанное в данном документе анти-GITR антитело или его фрагмент (например, VL-домен и/или VH-домен). В конкретных вариантах реализации изобретения оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая описанное в данном документе анти-GITR антитело или его фрагмент гибридизуется в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей описанное в данном документе анти-GITR антитело или его фрагмент. В конкретном варианте реализации изобретения оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая описанное в данном документе анти-GITR антитело или его фрагмент гибридизуется в условиях высокой, умеренной или низкой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей описанное в данном документе анти-GITR антитело или его фрагмент. Информация, касающаяся условий гибридизации, была описана, например, в публикации заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, параграфы 72-73), которая включена в данный документ посредством ссылки. Полинуклеотиды можно получать и определять нуклеотидную последовательность полинуклеотидов любым известным в данной области техники способом. Нуклеотидные последовательности, кодирующие описанные в данном документе антитела, например, антитела, описанные в табл. 1-4, и модифицированные версии этих антител, можно определить методами, хорошо известными в данной области техники, т.е. сборку нуклеотидных кодонов, кодирующих конкретные аминокислоты, проводят так, чтобы получить нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G et al. (1994), *BioTechniques* 17: 242-6), что, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, и амплификацию лигированных олигонуклеотидов посредством ПЦР.

В альтернативном варианте полинуклеотид, кодирующий описанное в данном документе антитело, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы), используя хорошо известные в данной области техники методы (например, ПЦР и другие методы молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с применением синтетических праймеров, которые гибридизуются с 3' и 5' концами известной последовательности, можно проводить, используя геномную ДНК, полученную из клеток гибридомы, вырабатывающих представляющее интерес антитело.

Такие методы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие методы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дополнительного клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, недоступен, но известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин можно синтезировать химически или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, полученной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли А+РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как клетки гибридомы, отобранные для экспрессии описанного в данном документе антитела) при помощи ПЦР-амплификации с применением синтетических праймеров, которые гибридизуются с 3' и 5' концами последовательности, или при помощи клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфического в отношении конкретной генной последовательности, для определения, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, который кодирует антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные при помощи ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы, используя любой хорошо известный в данной области техники метод. ДНК, кодирующую описанные в данном документе анти-GITR антитела, легко можно выделить и секвенировать при помощи традиционных процедур (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи анти-GITR антител). В качестве источника такой ДНК могут служить клетки гибридомы. После выделения ДНК можно вносить в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяев, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые в ином случае не вырабатывают белок иммуноглобулина, чтобы синтезировать анти-GITR антитела в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Для получения целых антител можно использовать ПЦР-праймеры, включая нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующие последовательности для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv. Используя известные специалистам в данной области техники методы клонирования, амплифицированные при помощи ПЦР VH-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например, человеческую константную область гамма 4, а амплифицированные при помощи ПЦР VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например, человеческие каппа или лямбда константные области. В определенных вариантах реализации изобретения векторы для экспрессии VH- или VL-доменов содержат промотор EF-1 α , сигнал секретиции, клонирующий сайт для переменного домена, константные домены и селективный маркер, такой как неомизин. VH- и VL-домены также можно клонировать в вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем конверсионные векторы тяжелой цепи и конверсионные векторы легкой цепи котрансфицируют в клеточные линии для получения стабильных или временных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, используя известные специалистам в данной области техники методы.

ДНК также можно модифицировать, например, путем замещения кодирующей последовательностью константных доменов человеческой тяжелой и легкой цепи мышиных последовательностей или путем ковалентного соединения кодирующей иммуноглобулин последовательности со всей или частью последовательности, кодирующей отличный от иммуноглобулина полипептид.

Также предложены полинуклеотиды, которые гибридизируются в условиях высокой, умеренной или низкой жесткости с полинуклеотидами, которые кодируют описанное в данном документе антитело. В конкретных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе полинуклеотиды гибридизируются в условиях высокой, умеренной или низкой жесткости с предложенными в данном документе полинуклеотидами, кодирующими VH-домен (например, SEQ ID NO: 201, 203, 206 и 215-389) и/или VL-домен (например, 202, 204, 205, 207, 208 и 400-518 или SEQ ID NO: 519).

Условия гибридизации были описаны в данной области техники и известны специалистам в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию со связанной на фильтре ДНК в $\times 6$ хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при около 45°C с последующими одной или более промывками в 0,2 $\times$ SSC/0,1% ДСН при около 50-65°C; гибридизация в условиях высокой жесткости может включать гибридизацию со связанной на фильтре нуклеиновой кислотой в 6 $\times$ SSC при около 45°C с последующими одной или более промывками в 0,1 $\times$ SSC/0,2% ДСН при около 68°C. Другие условия жесткости для гибридизации известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Ausubel FM et al., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., New York на страницах 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3.

5.2.2. Клетки и векторы

В определенных аспектах в данном документе предложены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) описанные в данном документе антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые специфически связываются с GITR (например, человеческим GITR), и связанные с ними полинуклеотиды и экспрессионные векторы. В данном документе предложены (например, экспрессионные векторы), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-GITR антитела или фрагменты, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно клетках млекопитающих. Также в данном документе предложены клетки-хозяева, содержащие такие векторы, для рекомбинантной экспрессии описанных в данном документе анти-GITR антител (например, человеческих или гуманизированных антител). В конкретном аспекте в данном документе предложены способы получения описанного в данном документе антитела, включающие экспрессию такого антитела из клетки-хозяина. Рекомбинантная экспрессия описанного в данном документе антитела (например, описанного в данном документе полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или одноцепочечного антитела), которое специфически связывается с GITR (например, человеческим GITR), включает конструирование экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело. После получения полинуклеотида, кодирующего описанную в данном документе молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (например, переменные домены тяжелой и/или легкой цепи), вектор для получения молекулы антитела можно получить при помощи технологии рекомбинантных ДНК, используя хорошо известные в данной области техники методы. Следовательно, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь). Способы, хорошо известные специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь) и подходящие сигналы управления транскрипцией и трансляцией. Эти способы включают, например, *in vitro* технологии рекомбинантных ДНК, синтетические технологии и *in vivo* генетическую рекомбинацию. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность,

кодирующую описанную в данном документе молекулу антитела, тяжелую или легкую цепь антитела, переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела или их фрагмент, или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанный с промотором. Такие векторы могут, например, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464), а переменные домены антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии полной тяжелой, полной легкой цепи или полных тяжелой и легкой цепей.

Экспрессионный вектор можно трансфицировать в клетку (например, клетку-хозяина) при помощи традиционных методов, а полученные в результате клетки затем культивировать при помощи традиционных методов для получения описанного в данном документе антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его фрагмента. Следовательно, в данном документе предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий описанное в данном документе антитело или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или их фрагменты, или одноцепочечное антитело (например, антитело, содержащее CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161), функционально связанный с промотором, для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В определенных вариантах реализации изобретения для экспрессии двухцепочечных антител векторы, кодирующие отдельно тяжелые и легкие цепи, можно коэкспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, как описано ниже. В определенных вариантах реализации изобретения клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь описанного в данном документе антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его фрагмента. В конкретных вариантах реализации изобретения клетка-хозяин содержит два разных вектора, при этом первый вектор содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи описанного в данном документе антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его фрагмента, а второй содержит полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи описанного в данном документе антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его фрагмента. В других вариантах реализации изобретения первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи описанного в данном документе антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его фрагмента, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи описанного в данном документе антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161). В конкретных вариантах реализации изобретения тяжелая цепь/переменная область тяжелой цепи экспрессируемая первой клеткой, ассоциирует с легкой цепью/переменной областью легкой цепи из второй клетки с образованием описанного в данном документе анти-GITR антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложена популяция клеток-хозяев, содержащая такие первую клетку-хозяина и вторую клетку-хозяина. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменную область легкой цепи описанного в данном документе анти-GITR антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител

pab2159, pab2160 или pab2161), и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи описанного в данном документе анти-GITR антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161).

Множество систем хозяин-экспрессионный вектор можно применять для экспрессии описанных в данном документе молекул антител (например, антител, содержащих CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161 (см., например, патент США № 5807715)). Такие системы хозяин-экспрессионный вектор представляют средства, при помощи которых можно получать и впоследствии очищать представляющие интерес кодирующие последовательности, но также представляют клетки, которые при трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями экспрессируют описанную в данном документе молекулу антитела *in situ*. Они включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантными экспрессионными векторами на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие антитело последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, содержащими кодирующие антитело последовательности; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирус), содержащими кодирующие антитело последовательности; системы клеток растений (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вирус мозаики цветной капусты, ВМЦК; вирус табачной мозаики, ВТМ) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазида), содержащими кодирующие антитело последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промотеры, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; 7,5K промотор вируса осповакцины). В конкретном варианте реализации изобретения клетки для экспрессии описанных в данном документе антител (например, антител, содержащих CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или их антигенсвязывающих фрагментов представляют собой клетки CHO, например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В конкретном варианте реализации изобретения клетки для экспрессии описанных в данном документе антител представляют собой человеческие клетки, например, человеческие клеточные линии. В конкретном варианте реализации изобретения экспрессионный вектор млекопитающих представляет собой pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В конкретном варианте реализации изобретения бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), в особенности в случае экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела, применяют для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной среднеранний промоторный элемент гена человеческого цитомегаловируса, являются эффективной системой экспрессии антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5; и Cockett MI et al. (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7). В определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антитела вырабатываются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном варианте реализации изобретения экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих описанные в данном документе антитела, которые иммуноспецифически связывают GITR (например, человеческий GITR), регулируется индуцибельным промотором, конститутивным промотором или тканеспецифическим промотором.

В бактериальных системах может быть преимущественно выбрано большое число экспрессионных векторов в зависимости от предполагаемого применения и экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда необходимо получение большого количества такого антитела для создания фармацевтических композиций молекул антител, желательно применять векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней слитых белковых продуктов, которые легко очищать. Такие векторы включают, но не ограничиваются этим, экспрессионный вектор pUR278 *E. coli* (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), в котором кодирующая антитело последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с кодирующими областями *lac Z* так, чтобы получить продукт слияния; векторы pIN (Inouye S & Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509); и тому подобные. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион 5-трансферазой (GST). В общем случае такие сли-

тые белки являются растворимыми и легко поддаются очистке из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными глутатион-агарозными гранулами с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX конструируют так, чтобы они содержали участки расщепления тромбином или протеазой фактора Ха так, чтобы клонированный целевой генный продукт мог высвободиться из компонента GST.

В системах насекомых для экспрессии чужеродных генов можно использовать, например, вирус ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcNPV). Этот вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированную последовательность можно отдельно клонировать в несущественные области (например ген полиэдрина) вируса и помещать под управление промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина). В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать большое количество вирусных экспрессионных систем. В случаях применения в качестве экспрессионного вектора аденовируса представляющую интерес кодирующую последовательность можно лигировать в аденовирусный транскрипционный/трансляционный контрольный комплекс, например, поздний промотор и трехкомпонентную лидерную последовательность. Затем в геном аденовируса посредством *in vitro* или *in vivo* рекомбинации можно вставлять химерный ген. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способным экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9). Для эффективной трансляции вставленной кодирующей последовательности также могут требоваться специальные сигналы инициации. Эти сигналы включают кодон инициации ATG и смежные последовательности. Кроме того, кодон инициации должен находиться в фазе с рамкой считывания необходимой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию целой вставки. Эти экзогенные трансляционные контрольные сигналы и кодоны инициации могут иметь разное происхождение, как естественное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии можно повысить путем включения соответствующих транскрипционных энхансерных элементов, транскрипционных терминаторов и т.д. (см., например, Bitter G et al. (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544).

Кроме того, можно выбрать штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей, или модифицирует и процессирует генный продукт конкретным необходимым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функционирования белка. Разные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Чтобы гарантировать правильную модификацию и процессинг экспрессируемого чужеродного белка, можно выбирать соответствующие клеточные линии или системы клеток-хозяев. С этой точки зрения можно использовать эукариотические клетки-хозяев, которые обладают клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток мышиной миеломы, которая эндогенно не вырабатывает каких-либо цепей иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе анти-GITR антитела (например, антитело, содержащее CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) получают в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

В конкретном варианте реализации изобретения описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты имеют сниженное содержание фукозы или не содержат фукозу. Такие антитела можно получать методами, известными специалисту в данной области техники. Например, антитела можно экспрессировать в клетках с недостаточной или отсутствующей способностью к фукозилрованию. В конкретном примере для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов со сниженным содержанием фукозы можно использовать линии клеток с нокаутом обоих аллелей α 1,6-фукозилтрансферазы. Система Potelligent® (Lonza) является примером системы, которую можно использовать для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов со сниженным содержанием фукозы. Для длительного высокопродуктивного получения рекомбинантных белков можно создавать клетки со стабильной экспрессией. Например, можно конструировать линии клеток, которые стабильно экспрессируют описанное в данном документе анти-GITR антитело (например, антитело, содержащее CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах реализации изобретения предложенная в данном документе клетка стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельный домен легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный до-

мен тяжелой цепи, которые ассоциируют с образованием описанного в данном документе антитела (например, антитела, содержащего CDR любого из антител Hum231#1, Hum231#2, pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, 231-32-15 или антител 1-107, или антител pab2159, pab2160 или pab2161) или его антигенсвязывающего фрагмента.

В определенных аспектах вместо применения экспрессионных векторов, которые содержат вирусную точку начала репликации, клетки-хозяев можно трансформировать ДНК, управляемой соответствующими экспрессионными регуляторными элементами (например, промотор, энхансер, последовательности, терминаторы транскрипции, участки полиаденилирования и т.д.) и селективным маркером. После внесения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки оставляют расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем среду меняют на селективную. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием фокусов, которые, в свою очередь, можно клонировать и экспандировать в клеточные линии. Этот способ предпочтительно применять для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют описанное в данном документе анти-GITR антитело или его фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии могут быть в особенности полезны при проведении скрининга и оценки композиций, которые прямо или непрямо взаимодействуют с молекулой антитела. Можно использовать большое количество селекционных систем, включая, но не ограничиваясь этим, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M et al. (1977) Cell 11(1): 223-32), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) и аденин-фосфорибозилтрансферазы (Lowy I et al. (1980) Cell 22(3): 817-23), которые можно применять в tk-, hgprrt- или aprt-клетках соответственно. Также можно использовать устойчивость к антиметаболитам в качестве основы для селекции для следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M et al. (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K et al. (1981) PNAS 78: 1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Feigner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); и hygR, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre RF et al. (1984) Gene 30(1-3): 147-56). Обычные способы, известные в области технологий рекомбинантных ДНК, которые можно применять для отбора желаемого рекомбинантного клона, описаны, например, в Ausubel FM et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в Главах 12 и 13, Dracopoli NC et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F et al. (1981) J Mol Biol 150: 1-14, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить посредством амплификации вектора (обзор см. в Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Если маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, повышение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клеток-хозяев, будет приводить к повышению числа копий маркерного гена. Так как амплифицируемая область связана с геном антитела, также будет повышаться выработка антитела (Crouse GF et al. (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66). Клетку-хозяина можно котрансфицировать двумя или более описанными в данном документе экспрессионными векторами, при этом первый вектор кодирует полипептид тяжелой цепи, а второй вектор кодирует полипептид легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, которые обеспечивают одинаковую экспрессию полипептидов легкой и тяжелой цепей. Клетки-хозяев можно котрансфицировать разными количествами двух или более экспрессионных векторов. Например, клетки-хозяев можно трансфицировать любым из следующих соотношений между первым экспрессионным вектором и вторым экспрессионным вектором: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50. В альтернативном варианте можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды легкой и тяжелой цепи. В таких ситуациях легкую цепь следует размещать перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка нетоксичной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; and Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199). Кодированные последовательности тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Экспрессионный вектор может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать в следующем порядке: промотор, первый ген (например, тяжелой цепи описанного в данном документе антитела) и второй ген (например, легкой цепи описанного в данном документе антитела). В таком экспрессионном векторе транскрипция обоих генов может находиться под управлением промотора, в то время как трансляция мРНК с первого гена может осуществляться кэп-зависимым сканирующим механизмом, а трансляция мРНК со второго гена может осуществляться кэп-независимым механизмом, например, посредством IRES. После

получения описанной в данном документе молекулы антитела путем рекомбинантной экспрессии ее можно очищать любым известным в данной области техники способом очистки молекул иммуноглобулина, например, посредством хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности аффинной в отношении конкретного антигена после протеина А, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любого другого стандартного метода очистки белков. Кроме того, описанные в данном документе антитела можно сливать с описанными в данном документе или известными в данной области техники гетерологичными полипептидными последовательностями для облегчения очистки. [00389] В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является очищенным или выделенным. В общем случае выделенное антитело - это антитело, которое в значительной степени свободно от других антител с антигенными специфичностями, отличными от выделенного антитела. Например, в конкретном варианте реализации изобретения препарат описанного в данном документе антитела является в значительной степени свободным от клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение "в значительной степени свободные от клеточного материала" включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно было выделено или рекомбинантно получено. Таким образом, антитело, которое является в значительной степени свободным от клеточного материала, включает препараты антитела, содержащие менее чем около 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (по сухой массе) гетерологичного белка (также называемого в данном документе "загрязняющим белком"), и/или варианты антитела, например, разные посттрансляционно модифицированные формы антитела или другие отличные версии антитела (например, фрагменты антитела). При рекомбинантном получении антитела оно в общем случае также в значительной степени свободно от культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее чем около 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% от объема белкового препарата. При химическом синтезе антитела оно в общем случае в значительной степени свободно от химических предшественников или других химических веществ, т.е. оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые вовлечены в синтез белка. Соответственно, такие препараты антитела содержат менее чем около 30%, 20%, 10% или 5% (по сухой массе) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. В конкретном варианте реализации изобретения описанные в данном документе антитела являются выделенными или очищенными.

5.3. Фармацевтические композиции

В данном документе предложены композиции, содержащие описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее необходимую степень очистки, в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; феноловый, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу и декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТУ; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные сурфактанты, такие как ТВИН™, ПЛЮРОНИКИ™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). В конкретном варианте реализации изобретения фармацевтические композиции содержат описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном варианте реализации изобретения фармацевтические композиции содержат эффективное количество описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. См. раздел 5.4, ниже, в отношении примеров профилактических или терапевтических агентов. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело является единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Описанные в данном документе фармацевтические композиции можно применять для повышения, индукции или активации активности G1TR и лечения патологического состояния, такого как рак или инфекционное заболевание.

Фармацевтически приемлемые носители, применяемые в парентеральных препаратах, включают водные среды, неводные среды, противомикробные агенты, изотоничные агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульсифицирующие агенты, комплексообразующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных сред включают инъекцию хлорида натрия, инъекцию раствора Рингера, изотоничную

инъекцию декстрозы, инъекцию стерильной воды, инъекцию декстрозы и лактатного раствора Рингера. Неводные парентеральные среды включают жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Противомикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях можно добавлять в парентеральные препараты, находящиеся в многодозовых емкостях, которые включают фенолы или крезолы, препараты ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, сложные эфиры метил и пропил п-оксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотоничные агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают новокаин. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульсифицирующие агенты включают полисорбат 80 (ТВИН® 80). Комплексообразующий или хелатирующий агент ионов металлов включает ЭДТУ. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для водорастворимых сред; и гидроксид натрия, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для доведения pH. Фармацевтическую композицию можно составлять для любого пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, ингаляционный, трансдермальный, интрадермальный и парентеральный. Парентеральное введение, включающее подкожную, внутримышечную или внутривенную инъекцию, также предполагается в данном документе. Инъекционные препараты могут быть приготовлены в традиционных формах, то есть, в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, предназначенных для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или эмульсий. Инъекционные препараты, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, солевой раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при желании предназначенные для применения фармацевтические композиции также могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульсифицирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, такие как, например, ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и циклодекстрины. Препараты для парентерального введения антитела включают стерильные растворы для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для соединения с растворителем непосредственно перед применением, включая гиподермические таблетки, стерильные суспензии для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для соединения с носителем непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть как водными, так и неводными.

В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор или фосфатно-солевой буфер (PBS) и растворы, содержащие сгущающие и солюбилизирующие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, а также их смеси. Местные смеси, содержащие антитело, готовят, как описано для местного и системного введения. Получаемая в результате смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсии и им подобные формы могут быть приготовлены в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, распыляемых растворов, спреев, суппозиториях, бандажей, кожных накладок или любых других лекарственных форм, подходящих для местного введения. Описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получать в форме аэрозоля для местного применения, например, ингаляции (см., например, патенты США № 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, применяемого для лечения воспалительных заболеваний, в частности, астмы). Такие препараты для введения в дыхательные пути могут иметь форму аэрозоля или раствора для распылителя, или мелкого порошка для вдывания, одни или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы препарата будут в одном варианте реализации изобретения иметь диаметр меньше 50 мкм, в одном варианте реализации изобретения - меньше 10 мкм. Описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получать для местного применения, например для местного применения к коже и слизистым оболочкам, таким как в глазах, в форме гелей, кремов и лосьонов для применения на глазах, или для интраокулярного или интраспинального применения. Местное введение предполагается в случае трансдермальной доставки, а также в случае применения к глазам или слизистым оболочкам или в случае ингаляционных видов терапии. Также можно применять назальные растворы одного антитела или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Трансдермальные наклейки, включая ионофоретические и электрофоретические устройства, хорошо известны специалистам в данной области техники и могут применяться для введения антитела. Например, такие наклейки раскрыты в патентах США № 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция, содержащая описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представляет собой лиофилизированный порошок, который можно восстанавливать для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Также его можно восстанавливать и получать в форме твердого вещества или геля. Лيوфилизированный порошок готовят путем растворения описанного в данном документе антитела или

его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок стерилизован. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое улучшает стабильность или другое фармакологическое свойство порошка или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. Вспомогательные вещества, которые можно применять, включают, но не ограничиваются этим, декстрозу, сорбитол, фруктозу, кукурузный сироп, ксилитол, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Раствор также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники, при, в одном варианте реализации изобретения, приблизительно нейтральном pH. Последующая стерильная фильтрация раствора, за которой следует лиофилизация в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, обеспечивает получение необходимого препарата. В одном варианте реализации изобретения получаемый в результате раствор распределяют по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон содержит одну дозировку или несколько дозировок соединения. Лиофилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, например, от около 4°C до комнатной температуры. Восстановление такого лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает получение препарата для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено эмпирически.

Описанные в данном документе антители или их антигенсвязывающие фрагменты и другие предложенные в данном документе композиции также могут быть нацелены на конкретную ткань, рецептор или участок организма субъекта, подлежащего лечению. Специалистам в данной области техники хорошо известно много таких методов нацеливания. Все такие методы нацеливания предполагаются в данном документе для применения в предложенных композициях. Неограничивающие примеры методов нацеливания см., например, в патентах США № 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нацелено на опухоль.

Композиции можно для применения для *in vivo* введения могут быть стерильными. Это легко достигается при помощи фильтрации, например, через стерильные фильтровальные мембраны.

5.4. Применения и способы

5.4.1. Терапевтические применения и способы

В одном аспекте в данном документе представлены способы модуляции одной или более иммунных функций или одного или более иммунных ответов у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту описанного в данном документе анти-GITR антителя или его антигенсвязывающего фрагмента или их композиции. В конкретном аспекте в данном документе представлены способы активации, повышения или индукции одной или более иммунных функций или одного или более иммунных ответов у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту описанного в данном документе анти-GITR антителя или его антигенсвязывающего фрагмента или их композиции. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе представлены способы предотвращения и/или лечения заболеваний, при которых необходимо активировать или повысить одну или более иммунных функций или один или более иммунных ответов у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту описанного в данном документе анти-GITR антителя или его антигенсвязывающего фрагмента или их композиции. В других конкретных вариантах реализации изобретения способ включает комбинированную терапию, при этом анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с другим видом терапии, таким, как те, что описаны ниже, для активации или повышения одной или более иммунных функций или одного или более иммунных ответов. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят как адъювант в комбинации с антигенной композицией. В определенных вариантах реализации изобретения антигенная композиция содержит раковый или опухолевый антиген (например, антиген bcr/abl лейкемии, антигены HPV E6 и E7 онкогенного вируса, связанного с раком шейки матки, антигены MAGE1 и MZ2-E меланомы или связанные с меланомой или антигены MVC-1 и HER-2 рака молочной железы или связанные с раком молочной железы). В некоторых вариантах реализации изобретения антигенная композиция содержит антиген, полученный из патогена (например, вирусный антиген, паразитарный антиген, бактериальный антиген или грибковый антиген). Примеры вирусных антигенов включают нуклеопротеин (NP) вируса гриппа, антигены ВИЧ (например, белки gag ВИЧ, белок env ВИЧ (например, gp120 и/или gp41), белок Nef ВИЧ, белки Pol ВИЧ, обратную транскриптазу ВИЧ или протеазу ВИЧ), антигены вируса Эбола (EBOV) (например, NP или гликопротеин EBOV), антигены черной оспы, антигены вирусов гепатита А, В или С, антигены человеческого риновируса, антигены вируса простого герпеса, антигены полиовируса, антигены вируса ящура (FMDV), антигены вируса бешенства, антигены ротавируса, антигены вируса Коксаки и антигены вируса папилломы человека (ВПЧ). Примеры бактериальных антигенов включают антигены *Bordetella pertussis* (например, антигены белка P69 и филаментного гемагглютинина (ФГА)), *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis* и *E. coli*, такие как субъединица В термолabile токсина

(LT-B) *E. coli*, антигены K88 *E. coli* и антигены энтеротоксигенной *E. coli*.

В контексте данного документа термин "в комбинации" относится к применению более чем одного терапевтического средства (например, одного или более профилактических и/или терапевтических агентов). Применение термина "в комбинации" не накладывает ограничений на порядок, в котором терапевтические средства вводят субъекту с заболеванием или нарушением, или путь введения. Первое терапевтическое средство (например, профилактический или терапевтический агент) можно вводить до (например, за 5, 15, 30, 45 мин, 1 ч, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч, 1 неделю, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель), одновременно или после (например, через 5, 15, 30, 45 мин, 1 ч, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч, 1 неделю, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель) введения второго терапевтического средства (например, профилактического или терапевтического агента) субъекту с заболеванием или нарушением или их симптомом. В определенных вариантах реализации изобретения терапевтическое средство (например, агент) вводят субъекту в комбинации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в одной композиции (например, фармацевтической композиции). В других вариантах реализации изобретения терапевтическое средство (например, агент) вводят субъекту в комбинации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в разных композициях (например, двух или более фармацевтических композициях). Две композиции можно вводить в одно и то же или в разное время и/или одним и тем же или разными путями. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с вакцинной композицией, чтобы индуцировать, активировать или усилить иммунный ответ, вызываемый вакцинной композицией. В одном варианте реализации изобретения вакцинная композиция представляет собой противораковую вакцину. Противораковой вакциной является агент, молекула или иммуноген, который стимулирует или вызывает у индивида или субъекта эндогенный иммунный ответ против одного или более раковых антигенов. Раковым антигеном может быть опухолеассоциированный пептид или белок, который индуцирует или усиливает иммунный ответ и получен из опухолеассоциированных генов и кодируемых ими белков, например, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-A13, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (AGE-B4), тирозиназы, гликогенфосфорилаза головного мозга, Melan-A, MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1, CT-7, альфа-актина-4, слитого белка Bcr-Abl, Casp-8, бета-катенина, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, слитого белка dek-can, EF2, слитого белка ETV6-AML1, слитого белка LDLR-фукозилтрансфераза-AS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2 и 3, neo-PAP, миозина класса I, OS-9, слитого белка pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, триозофосфатизомеразы, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, Mage-C2, NA-88, /Lage-2, SP17 и TRP2-Int2, (MART-I), gp100 (Pmel 17), TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, p15(58), CEA, NY-ESO (LAGE), SCP-1, Hom/Mel-40, p53, H-Ras, HER-2/neu, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигенов вируса Эпштейна-Барр, EBNA, антигенов вируса папилломы человека (ВПЧ) E6 и E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенина, CDK4, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, теломеразы, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротейна, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\170K, NYCO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (Mac-2-связывающий белок/циклофилин С-ассоциированный белок), TAAL6, TAG72, TLP и TPS. Противораковые вакцины применимы как для повышения распознавания иммунной системой раковых клеток, так и для повышения противоопухолевого ответа посредством активации лимфоцитов. Были успешно получены эффекторные Т-клетки путем иммунизации интактными опухолевыми клетками или экстрактом, очищенными антигенами, применения пептидов, оптимизированных для связывания как с ГКГС, так и РТК, иммунных доминантных пептидов, ДНК, кодирующей опухолевые антигены, рекомбинантных вирусов, кодирующих опухолевые антигены, или облученных антигеном антигенпрезентирующих клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения повышение иммунного распознавания и экспансию клеток можно улучшить путем применения костимуляторов и цитокинов, инъекции векторов для экспрессии цитокинов, *in vitro* облученных антигеном и активированных аутологичных клеток и путем блокирования отрицательных модуляторов (например, применяя агенты, нацеленные на иммунные контрольные точки) и путем истощения Т-регуляторных клеток.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока или противопатогенной вакциной на основе белка теплового шока. См. разделы 5.4.1.1 и 5.4.1.2 в отношении противоопухолевых вакцин на основе белка теплового шока или противопатогенных вакцин на основе белка теплового шока для применения в комбинации с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с адьювантом для индукции, активации или усиления агонистического действия анти-GITR антитела. В зависимости от лечебного

контекста можно использовать различные адъюванты. Неограничивающие примеры подходящих адъювантов включают, например, полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адъювант *seppic*), адъювантную систему Риби (RAS), Titer Max, мурамилпептиды, адъювантную композицию Syntex (SAF), квасцы (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адъюванты на основе солей алюминия, адъюванты Gerbu®, захваченный на нитроцеллюлозе антиген, инкапсулированный или интегральный антиген, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21 и другие. Другие адъюванты включают олигонуклеотиды CpG и двухцепочечные молекулы РНК, такие как поли(А), поли(У). Также можно применять комбинации вышеприведенных адъювантов. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более адъювантов представляют собой сапонин, такой как QS-21, QS-21 и 3 De-O-алкилированный монофосфорил-липид А (3 D-MPL), и иммуностимулирующие олигонуклеотиды и адъюванты на основе сапонинов, раскрытые в патентах США № 6645495; 7029678 и 7858589 соответственно. В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены способы повышения стимуляции GITR-восприимчивых клеток (например, Т-клеток, таких как эффекторные Т-клетки), включающие инкубацию *ex vivo* GITR-восприимчивых клеток (например, Т-клеток) с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки инкубируют со стимулирующим агентом (например, фитогемагглютинином (ФГА) и/или форболмиристацетатом (ФМА), или антителом, стимулирующим РТК-комплекс, таким как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело) до, одновременно или после инкубации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки (например, Т-клетки) были выделены из организма субъекта (например, человека). В некоторых вариантах реализации изобретения после стимуляции анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом GITR-восприимчивые клетки вводят субъекту (например, человеку). GITR-восприимчивые клетки (например, Т-клетки) можно вводить тому же или другому субъекту, из организма которого ранее были выделены клетки.

В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе предложены способы активации GITR-восприимчивых клеток (например, Т-клеток), включающие инкубацию GITR-восприимчивых клеток (например, Т-клеток) с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки инкубируют со стимулирующим агентом (например, агентом, стимулирующим комплекс рецепторов Т-клеток, таким как, например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форболмиристацетат (ФМА), или антитело, стимулирующее РТК-комплекс, такое как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело) до, одновременно или после инкубации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки (например, Т-клетки) были выделены из организма субъекта (например, человека). В определенных вариантах реализации изобретения после активации анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом GITR-восприимчивые клетки вводят субъекту (например, человеку). GITR-восприимчивые клетки (например, Т-клетки) можно вводить тому же или другому субъекту, из организма которого ранее были выделены клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки, восприимчивые к GITR (т.е. GITR-восприимчивые клетки) инкубируют в клеточной культуре с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и вводят субъекту для повышения иммунной функции (например, для повышения экспансии/пролиферации GITR-восприимчивых клеток, таких как Т-клетки, и/или повышения эффекторной функции Т-клеток) и/или лечения рака, и/или предотвращения или лечения инфекционного заболевания. Примеры видов рака и инфекционных заболеваний приведены в данном документе. См., например, пример 7, ниже, в отношении типовых способов. В конкретных вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки представляют собой эффекторные Т-клетки (например, CD4⁺ и CD8⁺). В некоторых вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки выделены из организма субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки оценивают в отношении экспрессии GITR перед инкубацией с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки инкубируют с митогеном (например, митогеном Т-клеток, таким как, например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форболмиристацетат (ФМА), или антитело, стимулирующее РТК-комплекс, такое как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело) до, одновременно или после инкубации с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. GITR-восприимчивые клетки можно инкубировать с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, в течение 5, 10, 15, 30, 45 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18, 24 ч или более. В определенных вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки, которые вводят субъекту, были получены от субъекта (т.е. GITR-восприимчивые клетки являются аутологичными). В других вариантах реализации изобретения GITR-восприимчивые клетки, которые вводят субъекту, были получены от другого субъекта. После инкубации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом GITR-восприимчивые клетки можно местно или системно вводить субъекту любым известным специалисту в данной области техники путем (например,

парентерального введения, такого как подкожное, внутривенное или внутримышечное введение, или внутриопухолевого введения). В определенных вариантах реализации изобретения подходящая вводимая субъекту доза GITR-восприимчивых клеток после инкубации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом составляет 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1000, 5000, 10000, 25000, 50000, 100000, 1×10^6 , 1×10^7 или 1×10^8 клеток. После инкубации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом GITR-восприимчивые клетки можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более раз. Частота и доза GITR-восприимчивых клеток после инкубации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которую вводят субъекту, будет варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая, например, состояние пациента. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток (например, Т-клеток CD4+ и/или CD8+) у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток CD8+ у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток CD4+ у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток (например, Т-клеток CD4+ и/или CD8+) и/или эффекторной функции Т-клеток у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток CD8+ и/или эффекторной функции Т-клеток у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения экспансии Т-клеток CD4+ и/или эффекторной функции Т-клеток у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком. В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ преимущественной экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками, включающий инкубацию *ex vivo* Т-клеток с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент приводит экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент приводит экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками на от 10 до 20%, от 15 до 25%, от 25 до 50%, от 30 до 60%, от 50 до 75% или от 65 до 85%. Эффекторные Т-клетки и регуляторные Т-клетки можно отличить друг от друга по маркерам клеточной поверхности, таким как те, которые раскрыты в примерах ниже. В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки были выделены из организма субъекта (например, человека). В определенных вариантах реализации изобретения после экспансии Т-клетки вводят субъекту (например, человеку).

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ преимущественной экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанного в данном документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его композиции. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент приводит экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80% или более. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент приводит экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками на от 10 до 20%, от 15 до 25%, от 25 до 50%, от 30 до 60%, от 50 до 75% или от 65 до 85%. Эффекторные Т-клетки и регуляторные Т-клетки можно отличить друг от друга по маркерам клеточной поверхности и/или внутриклеточным маркерам, таким как те, которые раскрыты в примерах ниже. В конкретном варианте реализации изобретения субъект является человеком.

В определенных вариантах реализации изобретения лечение субъекта описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или его композицией приводит к одному, двум, трем, четырем или более следующим эффектам: (i) снижению или облегчению тяжести заболевания или связанного с ним симптома; (ii) снижению длительности симптома, связанного с заболеванием; (iii) ингибированию прогрессирования заболевания или связанного с ним симптома; (iv) рег-

рессии заболевания или связанного с ним симптома; (v) предотвращению развития симптома, связанного с заболеванием, которое есть у пациента; (vi) ингибированию повторного появления симптома, связанного с заболеванием; (vii) снижению госпитализации субъекта; (viii) снижению времени госпитализации субъекта; (ix) повышению выживаемости субъекта с заболеванием; (x) снижению числа симптомов, связанных с заболеванием; и (xi) усилению, улучшению, дополнению или расширению терапевтического(их) действия(ий) другого вида терапии. В альтернативном варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для предотвращения заболевания, такого как инфекционное заболевание. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту в комбинации с иммунотерапевтическим агентом. Раскрытые в данном документе иммунотерапевтические агенты для применения в комбинированной терапии включают, но не ограничиваются этим, антитело к Her2/рецептору пеп, такое как трастузумаб (под маркой Герцептин®), анти-CD52 антитело, такое как алектумаб (под маркой Кампат®, MabКампат® или Кампат-1H), анти-CD33 антитело, такое как гемтузумаб, связанное с калихеамицином (под маркой Милотарг®), анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб (под маркой Ритуксан® и MabТера®), ибритумаб тиуксетан (под маркой Зевалин®), анти-ФНО α антитела, такие как инфликсимаб (под маркой Ремикад®) или адалимумаб (под маркой Хумира®), растворимую молекулу ФНОR2, такую как этанерцепт (под маркой Энбрел®), антитело к CD25-цепи рецептора ИЛ-2, такое как базиликсимаб (под маркой Симулект®), анти-CD40/CD40L антитело, такое как гуманизированное IgG1 античеловеческое антитело к CD40 (SGN-40), агонисты Толл-подобных рецепторов, такие как монофосфорил-липид А (MPL®), CpG, одноцепочечную РНК, нуклеотиды, нуклеотидные аналоги, CL087 (TLR7-специфический лиганд), локсорибин, полиинозинполицитидиловую кислоту, флагеллин, резиквимод, имиквимод, гардиквимод, лиганды NOD, такие как мурамилдипептид, мурабутид, пептидогликан и мурамилдипептид, агонисты CD1d, такие как α -галактозилцерамид (α -GalCer) и треитолцерамид (ThrCer), антитело, такое как фрезолимуаb® (GC1008), антитело, нацеленное и ингибирующее изоформы TGF-бета 1, 2 или 3, продукт слияния Fc, далантерцепт (Alk-Fc) и низкомолекулярный LY2157299 (ингибитор рецепторных киназ). Заболевания, которые можно лечить посредством повышения иммунной функции, включают рак и инфекционные заболевания. Ниже описаны различные виды рака и инфекционных заболеваний. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять для лечения патологического состояния, связанного с раком, или патологического состояния, которое является результатом применения противораковой терапии (такой как, например, химиотерапия или облучение). В конкретном варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять для лечения или сдерживания развития лимфопении. В другом варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту, которому диагностировали рак, чтобы повысить пролиферацию и/или эффекторную функцию одной или более популяций иммунных клеток (например, эффекторных Т-клеток, таких как Т-клетки CD4+ и CD8+) у пациента.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент активирует или повышает, или индуцирует одну или более иммунных функций или один или более иммунных ответов у пациента по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 10%, или в диапазоне от 10 до 25%, от 25 до 50%, от 50 до 75% или от 75 до 95% по сравнению с иммунной функцией у субъекта, которому не вводили описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, согласно данным анализа, хорошо известного в данной области техники, например, ELISPOT, ELISA и анализа клеточной пролиферации. В конкретном варианте реализации изобретения иммунной функцией является выработка цитокинов (например, выработка интерферона-гамма, ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-12 или трансформирующего фактора роста (TGF) альфа). В другом варианте реализации изобретения иммунной функцией является пролиферация/экспансия Т-клеток, которую можно оценить, например, методом проточной цитометрии, чтобы определить количество клеток, экспрессирующих маркеры Т-клеток (например, CD3, CD4 или CD8). В другом варианте реализации изобретения иммунной функцией является выработка антител, которую можно оценить, например, методом ELISA. В некоторых вариантах реализации изобретения иммунной функцией является эффекторная функция, которую можно оценить, например, методом анализа цитотоксичности или другими методами, хорошо известными в данной области техники. В другом варианте реализации изобретения иммунной функцией является ответ Th1. В другом варианте реализации изобретения иммунной функцией является ответ Th2. В другом варианте реализации изобретения иммунной функцией является вторичный иммунный ответ. В конкретных вариантах реализации изобретения неограничивающие примеры иммунных функций, которые могут быть повышены или индуцированы анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, являются пролиферация/экспансия эффек-

торных лимфоцитов (например, повышение числе эффекторных Т-лимфоцитов), ингибирование апоптоза эффекторных лимфоцитов (например, эффекторных Т-лимфоцитов), и супрессия Тег. В конкретных вариантах реализации изобретения иммунная функция, повышаемая или индуцируемая описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, является пролиферацией/экспансией числа или активацией Т-клеток CD4+ (например, хелперных Т-клеток Th1 и Th2), Т-клеток CD8+ (например, цитотоксических Т-лимфоцитов, альфа/бета Т-клеток и гамма/дельта Т-клеток), В-клеток (например, плазматических клеток), Т-клеток памяти, В-клеток памяти, опухоль-оседлых Т-клеток, Т-клеток CD122+, естественных клеток-киллеров (NK-клеток), макрофагов, моноцитов, дендритных клеток, тучных клеток, эозинофилов, базофилов или полиморфноядерных лейкоцитов. В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент активирует или повышает пролиферацию/экспансию числа предшественников лимфоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент увеличивает число Т-клеток CD4+ (например, хелперных Т-клеток Th1 и Th2), Т-клеток CD8+ (например, цитотоксических Т-лимфоцитов, альфа/бета Т-клеток и гамма/дельта Т-клеток), В-клеток (например, плазматических клеток), Т-клеток памяти, В-клеток памяти, опухоль-оседлых Т-клеток, Т-клеток CD122+, естественных клеток-киллеров (NK-клеток), макрофагов, моноцитов, дендритных клеток, тучных клеток, эозинофилов, базофилов или полиморфноядерных лейкоцитов приблизительно по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 10%, или в диапазоне от 10 до 25%, от 25 до 50%, от 50 до 75% или от 75 до 95% по сравнению с отрицательным контролем (например, числом соответствующих клеток, которые не обрабатывали, не культивировали или не приводили в контакт с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом).

В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует, активирует или повышает активность человеческого GITR независимо от инициации РТК. В конкретных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), индуцирует, активирует или усиливает активность NF-κB независимо от инициации РТК. В определенных вариантах реализации изобретения активность NF-κB можно оценить, например, в анализе, включающем следующие этапы: (а) инкубацию Т-клеток (например, клеток Jurkat), экспрессирующих репортерную конструкцию NF-κB-люцифераза (например, конструкцию GloResponse NF-κB-luc2P) и GITR (например, человеческий GITR), с описанным в данном документе антителом или изотипическим контрольным антителом при концентрации антитела, например, 12,5, 10, 5, 2,5, 1,25 или 0,625 мкг/мл, в отсутствие анти-CD3 антитела; и (б) считывание сигнала люциферазы, например, после 2, 5, 6, 8 или 18 ч инкубации, например, при помощи мультиметочного ридера EnVision 2100, при этом положительный сигнал люциферазы по сравнению с изотипическим контрольным антителом свидетельствует об активности NF-κB. В конкретном варианте реализации изобретения сигнал люциферазы считывают после 5 ч инкубации.

В другом варианте реализации изобретения в данном документе предложен способ активации Т-клеток независимо от инициации РТК, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложен способ индукции, активации или повышения активности NF-κB независимо от инициации РТК, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения активность NF-κB можно оценить, например, в анализе, включающем следующие этапы: (а) инкубацию Т-клеток (например, клеток Jurkat), экспрессирующих репортерную конструкцию NF-κB-люцифераза (например, конструкцию GloResponse NF-κB-luc2P) и GITR (например, человеческий GITR), с описанным в данном документе антителом или изотипическим контрольным антителом при концентрации антитела, например, 12,5, 10, 5, 2,5, 1,25 или 0,625 мкг/мл, в отсутствие анти-CD3 антитела; и (б) считывание сигнала люциферазы, например, после 2, 5, 6, 8 или 18 ч инкубации, например, при помощи мультиметочного ридера EnVision 2100, при этом положительный сигнал люциферазы по сравнению с изотипическим контрольным антителом свидетельствует об активности NF-κB. В конкретном варианте реализации изобретения сигнал люциферазы считывают после 5 ч инкубации. В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения процентного содержания полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Повышение процентного содержания полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток можно оценить, например, в анализе, включающем следующие этапы: (а) инкубацию, например, человеческих МКГЖ, например, с

анти-CD3 антителом в различных субоптимальных концентрациях (например, 0,3-5 мкг/мл); и, например, описанным в данном документе антителом, которое иммуноспецифически связывается с GITR (например, человеческим GITR), при, например, 5 мкг/мл или изотипическим контрольным антителом в течение, например, 3-4 дней при 37°C и 5% CO₂; (b) обработку клеток, например, брeфелдином А в течение, например, 6 ч при 37°C и 5% CO₂; (c) окрашивание поверхности клеток при помощи, например, анти-CD3 антитела, анти-CD4 антитела и анти-CD8α антитела; (d) внутриклеточное окрашивание при помощи, например, анти-ИФНγ антитела и анти-ФНОα антитела; и (e) определение процентного содержания полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В конкретных вариантах реализации изобретения полифункциональные (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клетки выбраны из группы, состоящей из полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток CD4+ и полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток CD8+.

В конкретных вариантах реализации изобретения в данном документе предложен способ повышения поверхностной экспрессии OX40 и PD-1 в активированных Т-клетках, включающий приведение Т-клеток в контакт с описанным в данном документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Поверхностная экспрессия OX40 и PD-1 в активированных Т-клетках может быть повышена по меньшей мере в около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз согласно оценке методами, описанными в данном документе и/или известными специалисту в данной области техники, по сравнению с поверхностной экспрессией OX40 и PD-1 в активированных Т-клетках без описанного в данном документе антитела.

5.4.1.1. Рак

В конкретном аспекте в данном документе предложены способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его композиции. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композиция является единственным активным агентом, вводимым субъекту.

Действие описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента на пролиферацию раковых клеток можно определить обычными методами анализа, такими как те, в которых измеряют поглощение радиоактивно меченого тимидина. В альтернативном варианте жизнеспособность клеток можно определить методами анализа, в которых определяют лактатдегидрогеназу (ЛДГ) -стабильный цитозольный фермент, который высвобождается после клеточного лизиса, или по высвобождению [⁵¹Cr] после клеточного лизиса. В одном варианте реализации изобретения некроз определяют по способности или неспособности клетки поглощать краситель, такой как нейтральный красный, трипановый синий или синий ALAMAR™ (Page B et al. (1993) Intl J Oncology 3: 473-6). В таком анализе клетки инкубируют в среде, содержащей краситель, затем клетки промывают, а оставшийся краситель, отображающий клеточное поглощение красителя, определяют спектрофотометрическим способом. В другом варианте реализации изобретения краситель представляет собой сульфородамин В (SRB), чье связывание с белками можно использовать в качестве меры цитотоксичности (Skehan P et al. (1990) J Nat Cancer Inst 82: 1107-12). В другом варианте реализации изобретения тетразолиевую соль, такую как МТТ, используют в количественном колориметрическом анализе выживаемости и пролиферации клеток млекопитающих путем определения живых, но не мертвых клеток (см., например, Mosmann T (1983) J Immunol Methods 65: 55-63).

В других вариантах реализации изобретения в присоединенных и "блуждающих" компартментах культур определяют апоптотические клетки. Оба вида компартментов собирают путем удаления супернатанта, трипсинизации присоединенных клеток и смешивания обоих препаратов после этапа центрифугирования и промывки (10 мин, 2000 об/мин). Протокол обработки культур раковых клеток сулиндаком и сходными соединениями для получения значительной степени апоптоза был описано в литературе (см., например, Piazza GA et al. (1995) Cancer Res 55: 3110-6). Особенности этого способа включают сбор как блуждающих, так и присоединенных клеток, определение оптимального времени обработки и диапазона доз для наблюдения апоптоза и определения оптимальных условий клеточного культивирования. В другом варианте реализации изобретения количественную оценку апоптоза осуществляют путем определения фрагментации ДНК. Доступны коммерческие фотометрические способы для количественного *in vitro* определения фрагментации ДНК. Примеры таких методов анализа, включая анализ TUNEL (в котором определяют включение меченых нуклеотидов в фрагментированной ДНК) и ELISA, описаны в Biochemica, (1999) 2: 34 37 (Roche Molecular Biochemicals). В другом варианте реализации изобретения апоптоз можно наблюдать морфологически.

Линии раковых клеток, для которых можно проводить такой анализ, хорошо известны специалистам в данной области техники. Анализ апоптоза, некроза и пролиферации также можно проводить для первичных клеток, например, тканевого эксплантата.

В конкретных вариантах реализации изобретения введение описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его композиции субъекту с раком (в некоторых вариантах реализации изобретения животной модели рака) приводит по меньшей мере к одному,

двум, трем, четырем или более следующим эффектам: (i) снижению или облегчению тяжести одного или более симптомов рака; (ii) снижению продолжительности одного или более симптомов, связанных с раком; (iii) предотвращению повторного появления симптома, связанного с раком; (iv) снижению госпитализации субъекта; (v) снижению времени госпитализации; (vi) повышению выживаемости субъекта; (vii) усилению или улучшению терапевтического действия другого вида терапии; (viii) ингибированию развития или начала одного или более симптомов, связанных с раком; (ix) снижению числа симптомов, связанных с раком; (x) улучшению качества жизни согласно оценке методами, известными в данной области техники; (xi) ингибированию повторного появления опухоли; (xii) регрессии опухолей и/или одного или более связанных с ними симптомов; (xiii) ингибированию прогрессирования опухолей и/или одного или более связанных с ними симптомов; (xiv) снижению роста опухоли; (xv) уменьшению размера опухоли (например, объема или диаметра); (xvi) снижению образования новообразованных опухолей; (xvii) уничтожению, устранению или контролю первичных, региональных и/или метастатических опухолей; (xviii) снижению числа или размера метастазов; (xix) снижению смертности; (xx) повышению безрецидивной выживаемости; (xxi) размер опухоли сохраняется и не увеличивается или увеличивается меньше, чем опухоль после применения стандартной терапии, согласно определению традиционными методами, доступными специалисту в данной области техники, такими как магниторезонансная томография (МРТ), МРТ с динамическим контрастным усилением (МРТ-ДКУ), рентген и компьютерная томография (КТ) или позитронная эмиссионная томография (ПЭТ); и/или (xxii) увеличению времени ремиссии у пациентов.

В определенных вариантах реализации изобретения субъекту вводят два или более описанных в данном документе анти-GITR антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с одним или более другими видами терапии, например, противораковыми агентами, цитокинами, клеточными вакцинами или антигормональными агентами, для лечения рака.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с лучевой терапией, включающей, например, применение рентгеновского излучения, гамма-излучения и других источников излучения для разрушения раковых клеток. В конкретных вариантах реализации изобретения лучевую терапию проводят в виде наружной лучевой терапии или телетерапии, когда излучение поступает из удаленного источника. В других вариантах реализации изобретения лучевую терапию проводят в виде внутренней терапии или брахитерапии, когда источник излучения размещается внутри организма вблизи раковых клеток или опухолевой массы. В одном аспекте описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может активировать или повышать иммунную функцию или иммунный ответ у ракового пациента с ослабленной вследствие противораковой терапии иммунной системой.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с химиотерапией. В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять до, во время или после лучевой терапии или химиотерапии. Примеры химиотерапевтических агентов включают циклофосфамид, метотрексат, циклоспорин А, лефлуномид, цисплатин, ифосфамид, таксаны, такие как таксол и паклитаксел, ингибиторы топоизомеразы I (например, CPT 11, топотекан, 9 AC и GG 211), гемцитабин, винорелбин, оксалиплатин, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, винорелбин, темода, цитохалазин В, грамицидин D, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1 дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и гомологи пуромидина, и цитоксан. В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с циклофосфамидом, например, низкой дозой циклофосфамида. Циклофосфамид (Элостан, Цитоксан) представляет собой химиотерапевтический агент, который обладает иммуномодулирующей функцией при применении в низких дозах (например, до 300 мг/м^2 , 300 мг/м^2 или около 300 мг/м^2 при внутривенном введении). В частности, низкие дозы циклофосфамида могут снижать число и способность к пролиферации регуляторных Т-клеток (Treg) (например, клеток $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ или, в альтернативном варианте, клеток $\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-\text{FOXP3}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^{\text{low}}$) и модулировать иммуносупрессивные сети. В некоторых вариантах реализации изобретения дозировка вводимого циклофосфамида составляет около 50, 100, 200, 300, 500 мг/м^2 или более. В некоторых вариантах реализации изобретения дозировка вводимого циклофосфамида соответствует диапазону от 10 до 100 мг/м^2 , от 50 до 200 мг/м^2 , от 50 до 300 мг/м^2 , от 50 до 500 мг/м^2 . В некоторых вариантах реализации изобретения циклофосфамид вводят субъекту в течение 1, 2, 3, 4, 8, 12 ч, 1 дня, 5 дней или более до или после начального введения описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с циклофосфамидом, например, низкой дозой циклофосфамида, для лечения метастатической почечно-клеточной карциномы (ПКК). В одном

варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с Treg-ингибиторным агентом. Примеры Treg-ингибиторных агентов включают Зенапакс® (даклизумаб) (Roche), который представляет собой человеческое анти-CD25 моноклональное антитело, применяемое, например, для индукции иммунной супрессии при трансплантации органов. Даклизумаб блокирует связывание ИЛ-2 с CD25, который также является сигналом для поддержания Treg. Другим агентом, который ингибирует Treg, является Сутент® (Сунитиниб) (Pfizer), который является низкомолекулярным, многоцелевым ингибитором тирозинкиназы, утвержденным для лечения почечно-клеточной карциномы (ПКК) и других видов рака. Другим агентом, который может ингибировать Treg, является 1-метил-D-триптофан (1-MT) - конкурентный ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО). ИДО представляет собой иммуносупрессивный агент, экспрессируемый в некоторых нормальных и неопластических клетках, и может быть связан с повышением числа Treg у раковых пациентов. Дополнительные ингибиторы Treg включают агенты, которые блокируют перенос Treg в микроокружение опухолей. Такие агенты могут включать антитела против определенных хемокинов и рецепторов хемокинов, таких как CCL17, CCL22 и CCR4.

Дополнительные примеры Treg-ингибиторных агентов, которые можно применять в соответствии с описанными в данном документе способами, раскрыты в следующих патентных заявках, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патентные публикации США № US 2009/0214533, US 2012/0142750, US 2011/0305713, US 2009/0004213, US 2012/0219559, US 2010/0278844, US 2013/0323283 и US 2008/0152665.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту до, во время или после хирургического вмешательства.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с иммунным модулятором или антителом. Иммунные модуляторы или антитела могут представлять собой, но не ограничиваются этим, адъюванты, антигены, анти-CD3 (например, ОКТ3), нацеленные на контрольные точки агенты или модуляторы или интерлейкины. Термины "нацеленный на контрольные точки агент" или "модулятор контрольных точек" могут употребляться взаимозаменяемо и относятся к агенту, который избирательно модулирует экспрессию или активность регуляторной молекулы (например, коингибиторной молекулы контрольной точки (например, белка) или костимуляторной молекулы контрольной точки (например, белка), которая может быть, например, рецептором или лигандом контрольной точки иммунной системы. Нацеленные на контрольные точки агенты могут быть выбраны из группы, состоящей из агониста молекулы контрольной точки, антагониста молекулы контрольной точки, полипептида (например, пептидного лиганда, антитела или фрагмента антитела), который избирательно нацелен на молекулу контрольной точки; небольшой молекулы, которая избирательно нацелена на молекулу контрольной точки; и регуляторной нуклеиновой кислоты (например, миРНК, микроРНК), которая избирательно модулирует экспрессию или активность молекулы контрольной точки. В одном варианте реализации изобретения нацеленный на контрольные точки агент может быть выбран из группы, состоящей из антагониста PD-1, антагониста PD-L1, антагониста PD-L2, антагониста CTLA-4, антагониста TIM-3, антагониста LAG-3, агониста GITR и агониста OX40. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR агонистическое антитело (например, Hum231#1, Hum231#2 или Hum231#2w) или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в комбинации, например, с анти-CTLA-4 антагонистическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или другим нацеленным на контрольные точки агентом, как в одной фармацевтической композиции, так и в отдельных фармацевтических композициях, вводимых вместе или отдельно. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и агониста OX40 и/или антагониста(ов) LAG-3, TIM-3, PD-1 и/или CTLA-4. В некоторых вариантах реализации изобретения рак выбран из мультиформной глиобластомы, метастатической меланомы, резистентной метастатической меланомы, метастатического рака яичника, метастатической почечно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, детских опухолей головного мозга, высокодифференцированной астроцитомы, эпендимомы и медуллобластомы. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с агентом, который ингибирует (частично или полностью) передачу сигнала CTLA-4, таким как антитело, которое специфически связывается с человеческим CTLA-4 (например, тремелимумаб (Pfizer); ипилимумаб (Yervoy®, Bristol-Myers Squibb)) или слитый белок CTLA-4-Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с антагонистом CTLA-4 (например, тремелимумабом или ипилимумабом) для лечения метастатического рака яичника. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с антагонистом CTLA-4 (например, тремелимумабом или ипилимумабом) для лечения метастатического рака яичника, который устойчив к антагонисту

CTLA-4 (например, тремелимумабу или ипилимумабу). В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и антагонист CTLA-4 (например, тремелимумаб или ипилимумаб) применяют для лечения мультиформной глиобластомы. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома возникла повторно. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома диагностирована впервые. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, имеющего неметирированные промоторы MGMT. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома устойчива к терапии бевацизумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, который не проходил терапию бевацизумабом. Примеры анти-CTLA-4 антител, которые можно применять в раскрытых в данном документе способах лечения, раскрыты в следующих патентах и заявках на патенты, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: Международные публикации № WO 00/037504, WO 01/014424 и WO 09/100140; патенты США № 6207156 и 7034121. Дополнительные примеры анти-CTLA-4 антител, которые можно применять в соответствии с описанными в данном документе способами, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патенты США № 7465446 8263073; 8142778 и 8226946; и заявки на патент США № US 2003/086930, US 2005/226875, US 2007/243184, US 2009/123477 и US 2011/044953. В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с агентом, который ингибирует (частично или полностью) передачу сигнала LAG-3, таким как антитело, которое специфически связывается с человеческим LAG-3. Примеры анти-LAG-3 антител или их фрагментов, которые можно применять в описанных в данном документе способах лечения, раскрыты в следующих патентах и заявках на патенты, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патенты США № 6143273 и 6197524; патентные публикации США № US 2011/0150892, US 2010/0233183 и US 2010/196394.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с агентом, который ингибирует (частично или полностью) передачу сигнала TIM-3, таким как антитело, которое специфически связывается с человеческим TIM-3. Примеры анти-TIM-3 антител или их фрагментов, которые можно применять в описанных в данном документе способах лечения, раскрыты в следующих патентах и заявках на патенты, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патенты США № 7470428 и 8101176; публикации США № US 2013/0022623, US 2010/0100131, US 2010/0100131 и US 2010/061992.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с агентом, который ингибирует (частично или полностью) передачу сигнала PD-1, таким как антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-PD-1 антитело или его фрагмент вводят субъекту, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб (BMS-936558 или MDX1106) или ламбролизумаб (MK-3475), или пидилизумаб (CT-011). Дополнительные неограничивающие примеры анти-PD-1 антител, которые можно применять в раскрытых в данном документе способах лечения, раскрыты в следующих патентах и заявках на патенты, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патенты США № 6808710; 7488802; 8008449; 8114845 и 8168757, публикация США № US 2013/0202623 и публикация согласно PCT № WO 2013/033091. В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с агентом, который ингибирует (частично или полностью) активность PD-L1, таким как антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-PD-L1 антитело представляет собой BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 или MSB0010718C. Дополнительные неограничивающие примеры анти-PD-L1 антител, которые можно применять в раскрытых в данном документе способах лечения, раскрыты в следующих патентах и заявках на патенты, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патент США № 8168179 и публикации США № US 2010/0203056 и US 2003/0232323. В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с агентом, который ингибирует (частично или полностью) активность PD-L2, таким как антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-L2.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с агентом, который активирует или усиливает передачу сигнала OX-40, таким как антитело, которое специфически связывается с человеческим OX-40. Примеры анти-OX40 антител или их фрагментов, которые можно применять в описанных в данном документе способах лечения, раскрыты в следующих патентах и заявках на патенты, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патенты США № 7550140; 7807156; 8283450; 8614295 и 7531170; публикации США № US 2010/0196359, US 2010/0136030 и US

2013/0183315.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с вакциной, такой как описанная в данном документе, включая раздел 5.4.1, выше. В конкретном варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока. Белки теплового шока (heat shock proteins или HSP) составляют семейство высококонсервативных белков, повсеместно обнаруживаемых у всех видов. Их экспрессия может быть сильно индуцирована до намного более высоких уровней в результате теплового шока или других форм стресса, включая действие токсинов, окислительный стресс или глюкозную депривацию. В соответствии с молекулярной массой было классифицировано пять семейств: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляют иммуногенные пептиды через перекрестно-презентирующий путь в антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как макрофаги и дендритные клетки (ДК), что приводит к активации Т-клеток. HSP действуют в качестве носителей шаперонов опухолеассоциированных антигенных пептидов, образуя комплексы, способные индуцировать опухолеспецифический иммунитет. После высвобождения из умирающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген поглощаются антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом антигены процессируются в пептиды, которые связывают молекулы ГКГС класса I и класса II, что приводит к активации противоопухолевых Т-клеток CD8+ и CD4+. Иммунитет, вызванный комплексами HSP, полученными из опухолевых препаратов, специфически направлен против уникального репертуара антигенных пептидов, экспрессируемого раком каждого субъекта.

Пептидный комплекс белка теплового шока (HSPPC) представляет собой белок-пептидный комплекс, состоящий из белка теплового шока, нековалентно комплексированного с антигенными пептидами. HSPPC вызывает как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. В конкретном варианте реализации изобретения антигенный(ые) пептид(ы) демонстрирует(ют) антигенность в отношении рака, подлежащего лечению. HSPPC эффективно захватываются АПК посредством мембранных рецепторов (главным образом CD91) или посредством связывания с Толл-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию АПК с выработкой хемокинов и цитокинов, что приводит к активации естественных клеток-киллеров (NK), моноцитов и Th1 и Th2-опосредованных иммунных ответов. В некоторых вариантах реализации изобретения применяемые в раскрытых в данном документе способах HSPPC включают один или более белков теплового шока из семейства белков стрессов hsp60, hsp70 или hsp90, комплексированных с антигенными пептидами. В некоторых вариантах реализации изобретения HSPPC включают hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации двух или более белков. В конкретном варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с пептидным комплексом белка теплового шока (HSPPC), например, пептидным комплексом белка теплового шока-96 (HSPPC-96), для лечения рака, например, мультиформной глиобластомы. HSPPC-96 содержит 96 кДа белок теплового шока (Hsp), grp96, комплексированный с антигенными пептидами. HSPPC-96 представляет собой противораковый иммунопрепарат, получаемый из опухоли субъекта, и содержит раковые антигенные "отпечатки". В некоторых вариантах реализации изобретения эти отпечатки содержат уникальные антигены, которые присутствуют только на специфических раковых клетках конкретного субъекта, а инъекция вакцины предназначена, чтобы стимулировать иммунную систему субъекта к распознаванию и атаке любых клеток со специфическими раковыми отпечатками. В некоторых вариантах реализации изобретения HSPPC, например HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В конкретном варианте реализации изобретения HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли или ее метастаза того типа рака, лечение которого проводят. В другом конкретном варианте реализации изобретения HSPPC (например, HSPPC-96) является аутологичным для субъекта, лечение которого проводят. В некоторых вариантах реализации изобретения опухолевая ткань является некротической опухолевой тканью. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере 1 г (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 г) некротической опухолевой ткани используют для получения курса вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения после хирургического вмешательства некротическую опухолевую ткань замораживают перед применением в приготовлении вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения HSPPC, например HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани посредством очистки, фильтруют и готовят для инъекции вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например, HSPPC-96. В таких вариантах реализации изобретения HSPPC, например HSPPC-96, первые 4 дозы можно вводить ежедневно, а 2-8 дополнительных доз - раз в две недели.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с HSPPC-96 для лечения метастатической меланомы (например, резистентной метастатической меланомы), метастатического рака яичника или метастатической почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с HSPPC-96 для лечения мультиформной глиоб-

ластомы. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и антагонист CTLA-4 применяют в комбинации с HSPPC-96 для лечения мультиформной глиобластомы. В некоторых вариантах реализации изобретения подлежащий лечению субъект имеет ослабленный иммунитет (например, вследствие инфекции, например, ВИЧ, или по причине прохождения противораковой терапии (например, химиотерапии или облучения) перед введением HSPPC.

Дополнительные примеры HSPPC, которые можно применять в соответствии с описанными в данном документе способами, раскрыты в следующих патентах и заявках на патенты, которые в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки: патенты США № 6391306, 6383492, 6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с соединением, которое нацелено на иммуномодулирующие ферменты, такие как ИДО (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и ТДО (триптофан-2,3-диоксигеназа). В конкретных вариантах реализации изобретения такое соединение выбрано из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corporation), F001287 (Flexus Biosciences), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В одном варианте реализации изобретения соединение представляет собой эпикадостат. В другом варианте реализации изобретения соединение представляет собой F001287. В другом варианте реализации изобретения соединение представляет собой индоксимод. В другом варианте реализации изобретения соединение представляет собой NLG919.

Повышенные уровни CD4+CD25+ Treg у раковых пациентов препятствуют возникновению в организме-хозяине эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Кроме того, высокая частота Treg связана со снижением выживаемости пациентов (Curiel TJ et al. (2004) Nat Medicine 10(9): 942-9; Woo EY et al. (2002) J Immunol 168: 4272-6). При этом после снижения числа регуляторных Т-клеток в МКПК раковых пациентов наблюдали повышение иммунной активности (Dannull J et al. (2005) J Clin Invest 115(12): 3623-33). Число Treg, экспрессирующих на своей поверхности высокие уровни GITR, можно снизить при помощи анти-GITR антитела DTA-1 (Coe D et al. (2010) Cancer Immunol Immunother 59: 1367-77). В одном варианте реализации изобретения иммунная стратегия может включать ex vivo или in vivo снижение числа Treg при помощи анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, что приводит к снижению числа GITR-положительных клеток Treg.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с онколитическим вирусом, таким как Talimogene laherparepvec (OncoVEX GM-CSF) и CGTG-102 (Ad5/3-D24-GMCSF).

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с цитокинами, которые эффективно ингибируют рост опухоли/метастазы. Такие цитокины, лимфокины или другие гемопоэтические факторы включают, но не ограничиваются этим, М-CSF, GM-CSF, ФНО, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИФН, ФНО α , ФНО1, ФНО2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, тромбопоэтин, фактор стволовых клеток и эритропоэтин.

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с ингибиторами рецепторных тирозинкиназ, такими как иматиниба мезилат (выпускаемый под маркой Гливек® или Гливак®), эрлотиниб (ингибитор рецепторов EGF), выпускаемый сейчас под маркой Тарцева, или сунитиниб (выпускаемый под маркой Сутент®).

В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с антагонистическим антителом к TGF-бета, таким как Фрезолимуаб® (GC1008), антитело, нацеленное на и ингибирующее изоформы TGF-бета 1, 2 или 3. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту, у которого имеется или диагностирован рак. В конкретном варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его композицию вводят субъекту, у которого имеется или диагностирована мультиформная глиобластома. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома возникла повторно. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома диагностирована впервые. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, имеющего неметилированные промоторы MGMT. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома возникла повторно. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома диагностирована впервые. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, имеющего неметилированные промоторы MGMT. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома устойчива к терапии бевацизумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, который не проходил терапию бевацизумабом.

В определенных вариантах реализации изобретения пациенты, проходящие лечение в соответствии

с описанными в данном документе способами, ранее проходили лечение антибиотиками, противораковыми агентами или другую биологическую терапию/иммунотерапию. Среди этих пациентов есть рефрактерные пациенты, пациенты, которые слишком малы для традиционной терапии, и пациенты с повторно возникшими вирусными инфекциями несмотря на уход или применение существующих видов терапии. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, которому вводят описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию, не проходил терапию до введения антитела или его композиции. В других вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту, который проходил терапию до введения антитела или его композиции. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту, проходящему или восстанавливающемуся после иммуносупрессивной терапии. В определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту с раком, при этом раковые клетки экспрессируют GITRL. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, подлежащий лечению в соответствии с раскрытыми в данном документе способами, имеет ослабленный иммунитет (например, вследствие инфекции, например, ВИЧ, или по причине прохождения противораковой терапии (например, химиотерапии или облучения)). Как описано в данном документе, анти-GITR антитела оказывают влияние на поверхностную экспрессию белков, включая OX40, CD25 и PD-1. Соответственно, в определенных вариантах реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят до введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с OX40, CD25 или PD-1. Антагонистическое антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в то время, когда агонистическое антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент повышает поверхностную экспрессию PD-1 у субъекта по сравнению с экспрессией PD-1 у субъекта во время введения. Например, антагонистическое антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить по меньшей мере через 12 ч, по меньшей мере через 1 день, по меньшей мере через 2 дня, по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 4 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 6 дней или по меньшей мере через 7 дней после введения агонистического антитела к GITR. Антагонистическое антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до двух недель, от 1 дня до двух недель, от 2 дней до двух недель или от 3 дней до двух недель после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента. Антагонистическое антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до одной недели, от 1 дня до одной недели, от 2 дней до одной недели или от 3 дней до одной недели после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента.

Агонистическое антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в то время, когда агонистическое антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент повышает поверхностную экспрессию OX40 у субъекта по сравнению с экспрессией OX40 у субъекта во время введения. Например, агонистическое антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить по меньшей мере через 12 ч, по меньшей мере через 1 день, по меньшей мере через 2 дня, по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 4 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 6 дней или по меньшей мере через 7 дней после введения агонистического антитела к GITR. Агонистическое антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до двух недель, от 1 дня до двух недель, от 2 дней до двух недель или от 3 дней до двух недель после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента. Агонистическое антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до одной недели, от 1 дня до одной недели, от 2 дней до одной недели или от 3 дней до одной недели после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента.

Анти-CD25 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в то время, когда агонистическое антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент повышает поверхностную экспрессию CD25 у субъекта по сравнению с экспрессией CD25 у субъекта во время введения. Например, анти-CD25 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить по меньшей мере через 12 ч, по меньшей мере через 1 день, по меньшей мере через 2 дня, по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 4 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 6 дней или по меньшей мере через 7 дней после введения агонистического антитела к GITR. Анти-CD25 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до двух недель, от 1 дня до двух недель, от 2 дней до двух недель или от 3 дней до двух недель после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента. Анти-CD25 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до одной недели, от 1 дня до одной недели, от 2 дней до одной недели или от 3 дней до одной недели после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента.

Антагонистическое антитело к CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в то время, когда агонистическое антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент повышает поверхностную экспрессию CTLA-4 у субъекта по сравнению с экспрессией CTLA-4 у субъекта во время введения. Например, антагонистическое антитело к CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент можно

вводить по меньшей мере через 12 ч, по меньшей мере через 1 день, по меньшей мере через 2 дня, по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 4 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 6 дней или по меньшей мере через 7 дней после введения агонистического антитела к GITR. Антагонистическое антитело к CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до двух недель, от 1 дня до двух недель, от 2 дней до двух недель или от 3 дней до двух недель после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента. Антагонистическое антитело к CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить от 12 ч до одной недели, от 1 дня до одной недели, от 2 дней до одной недели или от 3 дней до одной недели после введения агонистического антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента.

Примеры рака, который можно лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются этим, В-клеточные лимфомы (например, В-клеточный лимфоцитарный лейкоз, В-клеточную неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому кожи, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому), базальноклеточную карциному, рак мочевого пузыря, бластоми, метастазы в головной мозг, рак молочной железы, лимфому Беркитта, карциному (например, аденокарциному (например, пищеводно-желудочного соединения)), рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак (рак толстой и прямой кишки), карциному эндометрия, рак пищевода, саркому Юинга, фолликулярную лимфому, рак желудка, карциному пищеводно-желудочного соединения, рак желудочно-кишечного тракта, глиобластоми (например, мультиформную глиобластоми, например, впервые диагностированную или возникшую повторно), глиому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи), метастазы в печень, ходжкинскую и неходжкинскую лимфому, рак почки (например, почечно-клеточную карциному и опухоли Вильмса), рак гортани, лейкоз (например, хронический миелоцитарный лейкоз, лейкоз ворсистых клеток), рак печени (например, гепатокарциному и гепатому), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), лимфобластную лимфому, лимфому, мантийноклеточную лимфому, метастатический рак головного мозга, метастатический рак, миелому (например, множественную миелому), нейробластоми, меланому глаза, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак простаты (например, гормонорезистентный (например, кастрационно-резистентный), метастатический, метастатический гормонорезистентный (например, кастрационно-резистентный, андроген-независимый)), почечно-клеточную карциному (например, метастатическую), карциному слюнной железы, саркому (например, рабдомиосаркому), рак кожи (например, меланому (например, метастатическую меланому)), саркому мягких тканей, солидную опухоль, плоскоклеточную карциному, синовиальную саркому, рак яичка, рак щитовидной железы, переходо-клеточный рак (рак уротелиальных клеток), увеальную меланому (например, метастатическую), веррукозную карциному, рак вульвы и макроглобулинемию Вальденстрема.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, представляет собой человеческую саркому или карциному, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак простаты, плоскоклеточную карциному базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному слюнной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному (например, метастатическую), гепатому, карциному желчного протока, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, мультиформную глиобластоми, астроцитому, медуллобластоми, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластоми, акустическую неврину, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластоми, ретинобластоми. В определенных вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, представляет собой острый лимфоцитарный лейкоз или острый миелоцитарный лейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз); болезнь Ходжкина; неходжкинскую болезнь; острый миелоидный лейкоз; В-клеточную лимфому; Т-клеточную лимфому; анапластическую крупноклеточную лимфому; интраокулярную лимфому; фолликулярную лимфому; лимфому тонкого кишечника; или лимфому маргинальной зоны селезенки. В определенных вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, представляет собой множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, гастроинтестинальные стромальные опухоли, рак головы и/или шеи (например, плоскоклеточную карциному гортаноглотки, плоскоклеточную карциному гортани, клеточную карциному ротоглотки или веррукозную карциному гортани), эндометриальную стромальную саркому, тучноклеточную саркому, саркому мягких тканей у взрослых, саркому матки, карциному из клеток Меркеля, уротелиальную карциному, меланому с метастазами в головной мозг, увеальную меланому, увеальную

меланому с метастазами в печень, немелкоклеточный рак легкого, рак прямой кишки или миелодиспластический синдром. В некоторых вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии со способами, является метастатическим. В определенных вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, включает рак простаты, рак молочной железы, рак легкого, колоректальный рак, меланому, рак бронхов, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак матки или эндометрия, рак полости рта или глотки, неходжкинскую лимфому, рак щитовидной железы, рак почки, рак желчных протоков, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, плоскоклеточный рак, мезотелиому, остеосаркому, тиому/карциному вилочковой железы, глиобласту, миелодиспластический синдром, саркому мягких тканей, DIPG (диффузную опухоль стволовых клеток мозга), аденокарциному, остеосаркому, хондросаркому, лейкоз или рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, включает карциному (например, аденокарциному), лимфому, бластому, меланому, саркому или лейкоз. В определенных вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, включает плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобласту, глиому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени (например, гепатокарциному и гепатому), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, воспалительный рак молочной железы, карциному из клеток Меркеля, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка, рак мочевого пузыря, карциному эндометрия, миелому (например, множественную миелому), карциному слюнных желез, рак почки (например, почечно-клеточную карциному и опухоли Вильмса), базальноклеточную карциному, меланому, рак простаты, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода, серозную аденокарциному или различные типы рака головы и шеи. В определенных вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, включает десмопластическую меланому, воспалительный рак молочной железы, тимому, рак прямой кишки, рак анального канала или операбельную или неоперабельную глиому ствола головного мозга. В конкретном варианте реализации изобретения рак представляет собой солидную опухоль. В другом конкретном варианте реализации изобретения рак представляет собой мультиформную глиобласту. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома возникла повторно. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома диагностирована впервые. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, имеющего неметилированные промоторы MGMT. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома устойчива к терапии бевацизумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, который не проходил терапию бевацизумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, представляет собой метастатическую меланому (например, резистентную метастатическую меланому), метастатический рак яичника или метастатическую почечно-клеточную карциному. В определенных вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, представляет собой меланому, которая устойчива к ипилимумабу. В некоторых вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, представляет собой меланому, которая устойчива к ниволумабу. В некоторых вариантах реализации изобретения рак, который лечат в соответствии с описанными в данном документе способами, представляет собой меланому, которая устойчива к ипилимумабу и ниволумабу.

5.4.1.2. Инфекционные заболевания

В конкретном аспекте в данном документе представлены способы предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, включающие введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его композиции. В одном варианте реализации изобретения в данном документе предложены способы предотвращения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, которую предотвращают и/или лечат в соответствии со способами, может быть вызвана определенным в данном документе инфекционным агентом. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композиция является единственным активным агентом, водимым субъекту. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию применяют в комбинации с противоинфекционными процедурами (например, противовирусными, противобактериальными, противогрибковыми или антигельминтными) для лечения инфекционных заболеваний.

Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предотвращать при помощи описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, вызваны инфекционными агентами, включая, но не ограничиваясь этим, бактерии, паразитов, грибки, простейшие и вирусы.

В конкретном варианте реализации изобретения инфекционные заболевания, которые лечат и/или предотвращают при помощи описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, вызваны вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются этим, вызываемые вирусом гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа (например, гриппа А или гриппа В), ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса типа I (ВПГ-I), простого герпеса типа II (ВПГ-II), чумы, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторным синцитиальным вирусом, вирусом папилломы, папавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, вирусом свинки, вирусом кори, вирусом коревой краснухи, полиовирусом, вирусом черной оспы, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II) и агентами вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, лихорадка денге или черная оспа. Бактериальные инфекции, которые можно предотвращать и/или лечить, включают инфекции, вызываемые *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызываемые бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются этим, *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), tetanus, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *mycobacterium*, коклюш, холеру, чуму, дифтерию, *chlamydia*, *S. aureus* и *legionella*.

Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызываемые простейшими, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются этим, лейшманию, кокцидиоз, заболевания, вызванные трипаносомами, шистосомами, или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, вызываемые паразитами, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются этим, заболевания, вызванные хламидиями и риккетсиями.

Грибковые заболевания или грибковые инфекции, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются этим, вызываемые инфекциями *Candida*, зигомикоза, мастита *Candida*, прогрессирующего диссеминированного трихоспороноза с латентной трихоспорономией, диссеминированного кандидоза, легочного паракокцидиомикоза, легочного аспергиллеза, пневмонии *Pneumocystis carinii*, криптококкового менингита, менингоэнцефалита *coccidioidal* и цереброспинального васкулита, инфекции *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микоза околоносовых пазух, эндокардита *Aspergillus fumigatus*, большеберцовой дисхондроплазии, вагинита *Candida glabrata*, орофарингеального кандидоза, X-сцепленной хронической гранулематозной болезни, дермифитии стопы, кожного кандидоза, микотического плацентита, диссеминированного трихоспороноза, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, микозного кератита, инфекции *Cryptococcus neoformans*, грибкового перитонита, инфекции *Curvularia geniculata*, стафилококкового эндофталмита, споротрихоза и дерматофитоза.

В определенных вариантах реализации изобретения введение субъекту (в некоторых вариантах реализации изобретения - животной модели) описанного в данном документе анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его композиции приводит к одному, двум, трем, четырем или более следующим эффектам: (i) снижению или облегчению тяжести инфекционного заболевания, инфекции или связанного с ними симптома; (ii) снижению длительности инфекционного заболевания, инфекции или связанного с ними симптома; (iii) ингибированию прогрессирования инфекционного заболевания, инфекции или связанного с ними симптома; (iv) регрессии инфекционного заболевания, инфекции или связанного с ними симптома; (v) ингибированию развития или начала инфекционного заболевания, инфекции или связанного с ними симптома; (vi) ингибированию повторного появления инфекционного заболевания или связанного с ним симптома; (vii) снижению или ингибированию распространения инфекционного агента из одной клетки в другую клетку, одной ткани в другую ткань или одного органа в другой орган; (viii) ингибированию или снижению распространения/передачи инфекционного агента от одного субъекта другому субъекту; (ix) снижению органной недостаточности, связанной с инфекционным заболеванием; (x) снижению госпитализации субъекта; (xi) снижению продолжительности госпитализации; (xii) повышению выживаемости субъекта с инфекционным заболеванием или инфекцией; (xiii) устранению инфекционного заболевания или инфекции; (xiv) ингибированию или снижению репликации инфекционного агента или инфекции; (xv) ингибированию или снижению попадания инфекционного агента в клетку(и); (xvi) ингибированию или снижению репликации генома инфекционного агента; (xvii) ингибированию или снижению сборки инфекционных агентов; (xviii) ингибированию или снижению высвобождения инфекционных агентов из клетки(ок); (xviii) снижению числа или титра инфекционных агентов; (xix) снижению числа симптомов, связанных с инфекционным заболеванием или инфекцией; (xx) усилению, улучшению, дополнению или расширению профилактического или терапевтического действия другого вида терапии;

и/или (ххi) предотвращению начала или прогрессирования вторичной инфекции, связанной с инфекционным заболеванием. В определенных вариантах реализации изобретения субъекту вводят два или более описанных в данном документе анти-GITR антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с одним или более другими видами терапии. В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с одним или более противогрибковыми средствами.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с одним или более антибиотиками. Примеры антибиотиков, которые можно применять в комбинации с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включают аминогликозидные антибиотики, гликопептиды, амфениколовые антибиотики, ансамициновые антибиотики, цефалоспорины, цефамицины, оксазолидиноны, пенициллины, хинолоны, стрептограмины, тетрациклины и их аналоги.

В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с одним или более противовирусными средствами. Примеры противовирусных агентов, которые можно применять в комбинации с описанным в данном документе анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включают ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы протеаз и ингибиторы слияния. В одном варианте реализации изобретения противовирусный агент представляет собой амантадин, фосфат осельтамивира, римантадин и занамивир. В другом варианте реализации изобретения противовирусный агент представляет собой ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, такой как делавирдин, эфавиренц или невирапин. В другом варианте реализации изобретения противовирусный агент представляет собой нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, такой как абакавир, диданозин, эмтрицитабин, эмтрицитабин, ламивудин, ставудин, тенофовир DF, залцитабин или зидовудин. В другом варианте реализации изобретения противовирусный агент представляет собой ингибитор протеаз, такой как ампренавир, атазанавир, фосампренавир, индинавир, лопинавир, нелфинавир, ритонавир или саквинавир. В другом варианте реализации изобретения противовирусный агент представляет собой ингибитор слияния, такой как энфувиртид. В другом варианте реализации изобретения противовирусный агент представляет собой фосфат осельтамивира, амфотерицин В или паливизумаб.

В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с вакциной, которая представляет собой препарат белка теплового шока, содержащий белок теплового шока, комплексированный с антигенными пептидами, содержащими антиген из патогена (например, вируса, бактерии, грибка и т.д.). В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с вакциной, которая представляет собой препарат белка теплового шока, содержащий белки теплового шока, комплексированные с антигенными пептидами, содержащими вирусные антигены (например, антигены ВИЧ-1 или ВИЧ-2). В некоторых вариантах реализации изобретения препарат белка теплового шока, содержащий белки теплового шока, комплексированные с антигенными пептидами, содержащими вирусные антигены (например, антигены ВИЧ-1 или ВИЧ-2), комбинируют с адъювантом, таким как QS-21. В некоторых вариантах реализации изобретения вакцина представляет собой HerpV (Agenus Inc.), которая является вакциной для лечения герпесных инфекций. Неограничивающий пример подходящей вакцины раскрыт в Mo A., et al. (2011), Vaccine 29: 8530-8541, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные неограничивающие примеры раскрыты в патенте США № 8541002, содержание которого в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту, страдающему от инфекционного заболевания, вызванного инфекционными агентами, включающими, без ограничений, бактерии, грибки, простейших и вирусы. В определенных вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту, у которого диагностировали инфекционное заболевание, вызванное инфекционными агентами, включающими, без ограничений, бактерии, грибки, простейших и вирусы. В некоторых вариантах реализации изобретения описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его композицию вводят субъекту с инфекцией. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, которого лечат в соответствии с описанным в данном документе методом, имеет сниженный или ослабленный иммунитет. В определенных вариантах реализации изобретения субъект, которого лечат в соответствии с описанными в данном документе методами, проходил, проходит или будет проходить другой вид терапии (например, противовирусным агентом, антибиотиком или противогрибковым агентом).

5.4.1.3. Пути введения и дозировка

Описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или композицию можно доставлять субъекту различными путями. Они включают, но не ограничиваются этим, парентеральный, интраназальный, интратрахеальный, пероральный, интрадермальный, местный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансдермальный, внутривенный, внутриопухолевый, конъюнктивальный и подкожный пути. Также можно применять ингаляционное введение, например, используя ингалятор или распылитель и лекарственную форму с аэрозолированным агентом для применения в виде спрея.

Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, которое будет эффективным для лечения и/или предотвращения патологического состояния, зависит от природы заболевания и может быть определено при помощи стандартных клинических методов.

Точная применяемая в композиции доза также зависит от пути введения и серьезности инфекции или вызванного ею заболевания, и должна назначаться в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами, касающимися каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут варьироваться в зависимости от средств введения, целевого участка, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), того, является ли пациент человеком или животным, других принимаемых медикаментов или от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациент является человеком, но также можно лечить отличных от человека млекопитающих, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозировки оптимально титруют, чтобы оптимизировать безопасность и эффективность.

В определенных вариантах реализации изобретения для определения оптимальных диапазонов дозировок применяют *in vitro* анализ. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных для *in vitro* или животных модельных систем.

Для пассивной иммунизации антителом (или его антигенсвязывающим фрагментом) диапазон дозировок составляет от около 0,0001 до 100 мг/кг и, более обычно, от 0,01 до 15 мг/кг массы тела пациента. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела или соответствовать диапазону 1-10 мг/кг, или, другими словами, 70 мг или 700 мг или в диапазоне 70-700 мг, соответственно, для 70 кг пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения вводимая пациенту дозировка составляет от около 1 мг/кг до около 20 мг/кг массы тела пациента. В общем случае человеческие антитела имеют большее время жизни в организме человека, чем антитела от других видов, вследствие иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто возможны более низкие дозировки человеческих антител и менее частое введение. Типовая схема лечения включает введение один раз каждые две недели или один раз в месяц, или один раз каждые 3 или 6 месяцев в течение периода, составляющего один год или несколько лет, или через интервалы в несколько лет. В некоторых способах субъекту одновременно вводят два или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов с разными специфичностями связывания. Обычно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят многократно. Интервалы между единичными дозировками могут составлять неделю, месяц, 3 месяца, 6 месяцев или год.

5.4.2. Выявление и диагностические применения

Описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (см., например, раздел 5.1) можно применять для анализа уровней белка GITR в биологическом образце при помощи классических иммуногистологических методов, известных специалистам в данной области техники, включая методы иммуноанализа, такие как ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие аналитические метки для антител известны в данной области техники и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки можно применять, чтобы метить описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В альтернативном варианте можно метить второе антитело, которое распознает описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и использовать в комбинации с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, для определения уровней белка GITR. Анализ уровня экспрессии белка GITR подразумевает качественные или количественные изменения или оценку уровня белка GITR в первом биологическом образце как прямо (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка), так и относительно (например, путем сравнения со связанным с заболеванием уровнем белка во втором биологическом образце). Можно измерять или оценивать уровень экспрессии полипептида GITR в первом биологическом образце и сравнивать со стандартным уровнем белка GITR, при этом за стандарт принимается второй биологический образец, полученный от индивида, не имеющего нарушений, или определенный по средним уровням популяции индивидов, не имеющих нарушений. Как известно в данной области техники, если известен "стандартный" уровень полипептида GITR, его можно повторно использовать в качестве стандарта для сравнения. В контексте данного документа "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному из организма субъекта, линии клеток, ткани или другого источника клеток, эффективно экспрессирующих GITR. Способы получения образцов биопсии тканей и жидкостей организма от жи-

вотных (например, людей) хорошо известны в данной области техники. Биологические образцы включают моноклеточные клетки периферической крови.

Описанное в данном документе анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять для прогноза, диагностирования, мониторинга и скрининга, включая *in vitro* и *in vivo* применения, хорошо известные и стандартные для специалиста в данной области техники и на основании настоящего описания. Прогностические, диагностические, мониторинговые и скрининговые методы анализа, а также наборы для *in vitro* оценки статуса иммунной системы и/или иммунного ответа можно применять для прогнозирования, диагностирования и мониторинга для оценки образцов от пациентов, включая тех, которые имеют или вероятно имеют нарушения иммунной системы, или принимая во внимание предполагаемый или желательный ответ иммунной системы, ответ на антиген или ответ на вакцину. Оценка статуса иммунной системы и/или иммунного ответа также полезна для определения соответствия пациента клиническому исследованию лекарственного препарата или введению конкретного химиотерапевтического агента или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включая их комбинации, по сравнению с другим агентом или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Этот тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже практикуется с применением антител против белка HER2 при раке молочной железы (HerceptinTM, Dako), при этом данный анализ также применяют для оценки пациентов для терапии антителом с применением Герцептина®. *In vivo* применения включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, и радиовизуализацию иммунных ответов.

В одном варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять в иммуногистохимии образцов биопсии.

В другом варианте реализации изобретения анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять для определения уровней GITR или уровней клеток, которые содержат GITR на поверхности мембран, а эти уровни затем можно связать с определенными симптомами заболевания. Описанные в данном документе анти-GITR антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут нести выявляемую или функциональную метку. При применении флуоресцентных меток для выявления и количественной оценки специфических представителей связывания можно применять доступную на данный момент микроскопию и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или комбинацию обоих методов, известных в данной области техники. Описанные в данном документе анти-GITR антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут нести флуоресцентную метку. Типовые флуоресцентные метки включают, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминкумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может нести радиоактивную метку, такую как изотопы ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹¹⁷Lu, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁹⁸Au, ²¹¹At, ²¹³Bi, ²²⁵Ac и ¹⁸⁶Re. При применении радиоактивных меток для выявления и количественной оценки специфического связывания анти-GITR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с GITR (например, человеческим GITR) можно применять доступные на данный момент процедуры подсчета, известные в данной области техники. В том случае, когда меткой является фермент, выявление можно осуществлять при помощи любых применяемых в настоящее время методов колориметрии, спектрофотометрии, флуороспектрофотометрии, амперометрии или газометрии, как известно в данной области техники. Его можно осуществлять путем приведения образца или контрольного образца в контакт с анти-GITR антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и GITR. Выявляют любые комплексы, образованные между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и GITR, и сравнивают для образца и контроля. В свете специфического связывания описанных в данном документе антител с GITR, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно применять для специфического выявления экспрессии GITR на поверхности клеток. Описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также можно применять для очистки GITR методом иммуоаффинной очистки.

Также в данный документ включена система анализа, которую можно получить в форме тестового набора для количественного анализа степени содержания, например, GITR или комплексов GITR/GITRL. Система или тестовый набор содержит меченый компонент, например, меченое антитело, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов. См., например, раздел 5.5, ниже, в отношении наборов.

5.5. Наборы

В данном документе предложены наборы, содержащие одно или более описанных в данном документе антител или их антигенсвязывающих фрагментов или их конъюгатов. В конкретном варианте реализации изобретения в данном документе предложен фармацевтический комплект или набор, содержащий одну или более емкостей, заполненных одним или более ингредиентами описанной в данном документе фармацевтической композиции, например, одним или более предложенными в данном документе антителами или их антигенсвязывающими фрагментами. В некоторых вариантах реализации изобретения

наборы содержат описанную в данном документе фармацевтическую композицию и любой профилактический или терапевтический агент, такой как те, которые описаны в данном документе. В определенных вариантах реализации изобретения наборы могут содержать митоген Т-клеток, такой как, например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форболмиристацетат (ФМА), или антитело, стимулирующее РТК-комплекс, такое как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. Необязательно, к таким емкостям может быть присоединено уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, которое отражает одобрение органа, контролирующего производство, применение или продажу, для применения на людях.

Также в данном документе предложены наборы, которые можно использовать в вышеприведенных способах. В одном варианте реализации изобретения набор содержит описанное в данном документе антитело, предпочтительно очищенное антитело, в одной или более емкостях. В конкретном варианте реализации изобретения описанные в данном документе наборы содержат в значительной степени очищенный антиген GITR (например, человеческий GITR) в качестве контроля. В другом конкретном варианте реализации изобретения описанные в данном документе наборы дополнительно содержат контрольное антитело, которое не реагирует с антигеном GITR. В другом конкретном варианте реализации изобретения описанные в данном документе наборы содержат один или более элементов для выявления связывания антитела с антигеном GITR (например, антитело может быть конъюгировано с выявляемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с выявляемым субстратом). В конкретных вариантах реализации изобретения предложенный в данном документе набор может содержать рекомбинантно полученный или химически синтезированный антиген GITR. Предлагаемый в наборе антиген GITR также может быть присоединен к твердой подложке. В более конкретном варианте реализации изобретения средства выявления из вышеописанных наборов включают твердую подложку, к которой присоединен антиген GITR. Такой набор также может содержать неприсоединенное, меченое репортером античеловеческое антитело или антимышиное/антикрысинае антитело. В этом варианте реализации изобретения связывание антитела с антигеном GITR можно выявить по связыванию указанного меченого репортером антитела.

Следующие примеры предложены в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

6. Примеры

Примеры в этом разделе (т.е. разделе 6) предложены в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

6.1. Пример 1: получение новых антител против человеческого GITR

В этом примере описано получение и характеристики мышиных антител, которые связываются с человеческим GITR. В частности, в этом примере описано получение мышиных антител, которые специфически связываются с человеческим GITR и демонстрируют костимулирующее действие на Т-клетки CD4+.

Для получения новых антител к GITR в качестве иммуногена применяли мышиные клетки CMS5a, трансфицированные человеческим GITR, в комбинации с адъювантом (монофосфорилипид А (МФЛ), димиколат трегалозы (ДМТ), мурамилдипептид (МДП) и адъювант Фрейнда (АФ)) на мышах BALB/c. Клетки селезенки от иммунизированных мышей сливали с линией клеток мышинной миеломы SP2/0. Скрининг супернатантов полученных клонов проводили при помощи смешанного анализа гемадсорбции для hGITR-трансфицированных клеток CMS5a и клеток CMS5a дикого типа. Отобранные супернатанты дополнительно исследовали методом ELISA на рекомбинантном белке hGITR (hGITR-Fc, Sigma). Продукт слияния #231 позволил получить четыре гибридомы (231-32-15, 231-1039-45, 231-1042-7 и 231-1333-21) с избирательной реактивностью в отношении человеческого GITR (иногда называемого в данном документе hGITR или huGITR) согласно данным МНА и ELISA. Антитела (все IgG1) очищали при помощи аффинной хроматографии с протеином G для дополнительного исследования.

Специфичность анти-GITR-антител исследовали методом вестерн-блоттинга против очищенного рекомбинантного человеческого GITR, рекомбинантного мышинового GITR, клеток CMS5a, трансфицированных человеческим GITR, клеток CMS5a дикого типа, активированных Т-клеток CD4+ и необработанных Т-клеток CD4+. Вестерн-блоттинг в невосстанавливающих условиях проиллюстрирован на фиг. 1. Анти-GITR антитела реагировали с очищенным рекомбинантным человеческим GITR, не реагировали с рекомбинантным мышинным GITR, реагировали с рекомбинантным человеческим GITR в клетках CMS5a и реагировали с природным человеческим GITR в активированных Т-клетках CD4+.

Анализ связывания лиганда (GITR-L) и моноклонального антитела с иммобилизованным huGITR проводили методом поверхностного плазмонного резонанса, а измерения проводили на BIAcore®. GITR (~1100 ЕО) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5, используя стандартное аминное сопряжение. Аналиты инжестировали поверх иммобилизованного GITR в течение 15 мин при скорости потока 5 мкл/мин с последующим 10-минутным периодом диссоциации. После проведения кинетических экспериментов одновременно рассчитывали аффинность и константы диссоциации при помощи программного обеспе-

чения BiaEvaluation® (Biacore Life Sciences). Связывание человеческого GITR-L анализировали в диапазоне концентраций 12,5-200 нМ, а мышиные анти-GITR моноклональные антитела анализировали в диапазоне концентраций 6,25-100 нМ. Антитела не связывались с иммобилизованным мышинным GITR. Аффинность и константы диссоциации для антител приведены ниже в табл. 9.

Таблица 9

Аналит	K _A (1/М)	K _D (М)
huGITR-L	1,81 × 10 ⁸	5,54 × 10 ⁻⁹
mAb 231-1039-45	4,20 × 10 ⁸	2,38 × 10 ⁻⁹
mAb 231-32-15	4,04 × 10 ⁸	2,47 × 10 ⁻⁹
mAb 231-1333-21	4,19 × 10 ⁸	2,39 × 10 ⁻⁹
mAb 231-1042-07	4,30 × 10 ⁸	2,33 × 10 ⁻⁹

Проводили секвенирование гибридом 231-32-15, 231-1039-45, 231-1042-7 и 231-1333-21 и обнаружили, что они имеют одинаковые последовательности кДНК и белка. Белковые последовательности VH и VL подтверждали методами N-концевого белкового секвенирования и масс-спектрометрии (МС) триптических гидролизатов. Последовательность варибельной области тяжелой цепи анти-GITR антител представляет собой SEQ ID NO: 201, а последовательность варибельной области легкой цепи анти-GITR антител представляет собой SEQ ID NO: 202. Последовательности гиперварибельных участков (CDR) варибельной области тяжелой цепи (VH) VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 соответствуют SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно, а последовательности CDR варибельной области легкой цепи (VL) VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 соответствуют SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно.

Конкурентное связывание новых 231-GITR антител сравнивали с коммерчески доступным анти-GITR моноклональным антителом (R&D Systems mAb689 клон 110416). Применяли трансфицированные GITR клетки CMS5a, которые инкубировали с немеченым анти-GITR mAb, с последующим добавлением PE-конъюгированного R&D mAb или Alexa 488-конъюгированного антитела 231-1039-45 или 213-1333-21 (данные не показаны для Alexa 488-конъюгированного антитела 213-1333-21), а результаты оценивали методом анализа FACS. Исследования блокирования анти-GITR mAb от R&D systems проиллюстрированы на фиг. 2A, а исследования блокирования антитела 231 (1039-45) проиллюстрированы на фиг. 2B. В этих исследованиях сначала не добавляли антитело, добавляли антитело R&D или немеченные исследуемые антитела (антитела 1042-7, 1039-45, 1331-21 или 32-15) и инкубировали с трансфицированными M5Sa-GITR клетками. Затем добавляли меченое антитело от R&D (фиг. 2A) или меченое 231-анти-GITR антитело 1039-45 (фиг. 2B). Новые антитела 231 (1042-7, 1039-45, 1333-21 или 32-15) только частично блокировали связывание антитела R&D, возможно, вследствие стерического несоответствия (фиг. 2A). Фиг. 2B иллюстрирует, что антитело R&D не блокирует связывание антитела 231-1039-45. Связывание 1039-45 ингибировалось любым из антител 231 (т.е. 1042-7, 1039-45, 1333-21 или 32-15). Характеристики связывания 231-GITR антител анализировали методом FACS, а результаты представлены на фиг. 3A-C. Фиг. 3A иллюстрирует окрашивание клеток CMS5a-GITR античеловеческим GITR IgG1 1333-21 антителом из двух разных партий (1 и 2) и антителом от R&D Systems. На фиг. 3B показана интенсивность флуоресценции ex vivo полученных из МКПК CD3-CD19- GITR+ и CD4+CD25+ GITR+ после окрашивания антителами 1042-7, 32-15, 1039-45, 1333-21 и антителом от R&D Systems. Анализ FACS этих in vivo полученных из МКПК клеток после связывания 1333-21 или антитела от R&D systems (mAb689 клон 110416) показан на фиг. 3C. После этого проводили исследования, чтобы оценить костимулирующее действие анти-GITR антитела на Т-клетки CD4+ в комбинации с анти-CD3 (ОКТ3) антителом. Наиболее существенное относительно костимулирующее действие наблюдали при комбинировании анти-GITR антител (231-1042-7, 231-32-15, 231-1039-45, 231-1333-21) с субоптимальной концентрацией (0,2 мкг/мл) ОКТ3. Анти-GITR антитело (5 мкг/мл) и ОКТ-3 антитело при разных концентрациях связывали с тканевыми культуральными планшетами, а затем инкубировали с CFSE-мечеными клетками CD4+. В среду добавляли ИЛ-2 (10 Е/мл), а клетки и антитела инкубировали еще 5 дней. По окончании 5 дней оценивали интенсивность CFSE, при этом поделенные клетки имели низкую интенсивность CFSE. Также измеряли уровень ИФНγ. Результаты для анти-GITR антител приведены на фиг. 4. При субоптимальной концентрации антитела ОКТ3 (0,2 мкг/мл) анти-GITR антитела оказывали существенное относительно действие на пролиферацию клеток CD4+. Повышение уровней ИФНγ по сравнению с контролями наблюдали в присутствии анти-GITR антитела в комбинации со всеми исследуемыми уровнями ОКТ3, при этом наиболее сильное действие наблюдали при 0,2 мкг/мл и 0,04 мкг/мл. Причиной разницы между исследуемыми антителами может быть варибельность результатов одного анализа и естественная варибельность между каждым препаратом антител (например, отдельным препаратом). Следует отметить, что в отсутствие ОКТ3 стимуляцию анти-GITR антителами не наблюдали. Костимулирующее действие анти-GITR антител с ОКТ3 зависело от количества анти-GITR антител (данные не показаны). В заключение необходимо отметить, что были выделены анти-GITR антитела, которые являются специфическими в отношении человеческого GITR и распознают рекомбинантный и естественный GITR. Эти антитела свя-

зывают hGfTR, экспрессируемый на hGfTR-трансфицированных клетках CMS5a, при 2,5-5 нг/мл и демонстрируют хорошее связывание в анализе FACS. Антитела также связывались с человеческими МПКК, включая Т-клетки, экспрессирующие естественный hGfTR. Их аффинность в отношении GfTR, определенная при помощи BIAcore®, соответствует K_A (1/м) приблизительно $4,2 \times 10^8$, K_D (м) $2,4 \times 10^{-9}$ (по сравнению с K_A $1,8 \times 10^8$ и K_D $5,5 \times 10^{-9}$ для GfTRL (лиганд)).

Антитела связываются с другим участком на hGfTR по сравнению с коммерчески доступным GfTR mAb (R&D).

Было продемонстрировано костимулирующее действие анти-GfTR моноклонального антитела с субоптимальными концентрациями (0,2 мкг/мл и 0,04 мкг/мл) анти-CD3 mAb (ОКТ3) на Т-клетки CD4+. Несмотря на присутствие регуляторных Т-клеток в популяции обогащенных Т-клеток CD4+, анти-GfTR антитела усиливали активность Т-клеток CD4.

6.2. Пример 2: гуманизация мышинового моноклонального антитела 231-32-15

В этом примере описана гуманизация мышинового антитела 231-32-15 и характеристики гуманизированных антител.

6.2.1. Гуманизация мышинового антитела 231-32-15

В данном примере описана гуманизация античеловеческого мышинового антитела к GfTR 231-32-15, включая отбор человеческих акцепторных каркасных областей.

6.2.2. Химеризация мышинового антитела 231-32-15

Мышинные переменные области VH и VL (каппа) из мышинового 231-32-15, имеющие последовательности SEQ ID NO: 201 и 202, соответственно, синтезировали при помощи GeneArt® (Life Technologies™). Были включены естественные лидерные последовательности из оригинальных мышинных переменных доменов вместе с адаптерами с сайтами рестрикции, чтобы сделать возможным клонирование этих переменных областей непосредственно в стандартный внутрилабораторный человеческий вектор IgG1 Vh (домены CH1-2-3) и вектор Vk (Ck1), чтобы создать химерные гены с мышинными Vh или Vk и человеческими константными областями. Затем экспрессионные векторы химерных тяжелой и легкой цепей котрансфицировали в клетки CHO в суспензии, чтобы получить белок химерного антитела для применения в проводимых ниже анализах. Это химерное антитело называется в примерах в разделе 6 "химерным родительским антителом 231-32-15". Это химерное родительское антитело 231-32-15 содержит замену T109S (т.е. замену треонина серином в позиции 109 по сравнению с последовательностью Fc дикого типа) согласно нумерации Кабата в константной области легкой цепи, что облегчает клонирование переменной области в рамке с константной областью. Эта мутация является консервативной модификацией, которая не влияет на связывание или функцию антитела.

Чтобы выбрать человеческие каркасные области для прививания CDR антитела 231-32-15 применяли метод гомологичного соответствия. Можно использовать базы данных, например, базу данных переменных генов зародышевой линии из локусов иммуноглобулина человека и мыши (база данных IMGT (международная информационная система ImMunoGeneTics®; Lefranc MP et al. (1999) Nucleic Acids Res 27(1): 209-12; Ruiz M et al. (2000) Nucleic Acids Res 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res 31(1): 307-10; Lefranc MP et al. (2005) Dev Comp Immunol 29(3): 185-203; Kaas Q et al. (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics 6(4): 253-64) или VBASE2 (Retter I et al. (2005) Nucleic Acids Res 33, Database issue D671-D674), или база данных Кабата (Johnson G et al. (2000) Nucleic Acids Res 28: 214-218)), или публикации (например, Kabat EA et al., выше), чтобы определить человеческие подсемейства, к которым принадлежат мышинные переменные области тяжелой и легкой цепи, и определить наиболее подходящую каркасную область человеческой зародышевой линии для применения в качестве акцепторной молекулы. Выбор последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи (VH и VL) в пределах этих семейств, предназначенных для применения в качестве акцептора, может основываться на гомологии последовательностей и/или совпадении структуры участков CDR1 и CDR2, чтобы способствовать сохранению соответствующего относительного порядка CDR после прививания.

Поиск по базе данных IMGT с использованием IgBLAST (доступной на веб-странице NCBI) показал хорошую гомологию между каркасной областью переменной области тяжелой цепи 231-32-15 и представителями подсемейств человеческих переменных областей тяжелой цепи 1 и 7. Наибольшую гомологию и идентичность последовательностей CDR и каркасной области наблюдали для последовательности зародышевой линии:IGHV1-2*02 (также известной как DP75; SEQ ID NO: 601) (59,2% идентичности; 58 аминокислотных остатков из 98), IGHV1-3*01 (SEQ ID NO: 602) (58,2% идентичности; 57/98), IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 603) (57,1% идентичности; 56/98), IGHV1-18*01 (SEQ ID NO: 604) и IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 605) (для обеих 56,1% идентичности; 55/98) и IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 606) (54,1% идентичности; 53/98). При применении того же подхода последовательность переменного домена легкой цепи 231-32-15 продемонстрировала хорошую гомологию с представителями подсемейств человеческих переменных областей легкой цепи каппа 3 и 4. Наибольшую гомологию и идентичность последовательностей CDR и каркасной области наблюдали для последовательности зародышевой линии: IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 607) (79,2% идентичности; 80 аминокислотных остатков из 101) и IGKV3-7*02

(SEQ ID NO: 608) (64,4% идентичности; 65/101).

В качестве отправной точки для процесса гуманизации была создана версия VH с привитыми CDR мышиного 231-32-15 с использованием человеческого IGHV1-2*02 в качестве акцептора человеческой каркасной области. Было проведено некоторое количество обратных мутаций в позициях остатков, которые могут влиять на конформации CDR или упаковку внутри варибельного домена и, следовательно, могут иметь структурное значение для поддержания полной активности антитела. В каркасной области 1 остаток H24 по Кабату сохраняли мышиным, так как он является каноническим остатком CDR1 (петля длиной в 5 аминокислотных остатков по определению Кабата). Он представляет собой Gly в мышиной последовательности и Ala в человеческой зародышевой линии. В каркасной области 2 остаток H48 по Кабату сохраняли мышиным, так как он известен как верньерный остаток (т.е. расположенный вблизи CDR). Он представляет собой Ile в мышиной последовательности и Met в человеческой зародышевой линии. В каркасной области 3 остатки H67 и 73 по Кабату, которые являются верньерными остатками, оставляли мышиными. H67 представляет собой Ala в мышиной последовательности и Val в IGHV1-2*02 человеческой зародышевой линии. H73 представляет собой Lys в мышиной последовательности и Thr в IGHV1-2*02 человеческой зародышевой линии. Остаток H71, который является критическим каноническим остатком CDR2, оставляли мышиным (он представляет собой Arg в человеческой зародышевой линии и Val в мышиной последовательности). Остаток H94 по Кабату, который является каноническим остатком CDR1, оставляли мышиным (он представляет собой Arg в человеческой зародышевой линии и Lys в мышиной последовательности). Конечная гуманизованная последовательность была названа версией VH A (SEQ ID NO: 206) и имела 79,6% идентичности (78 аминокислотных остатков из 98) с IGHV1-2*02 человеческой зародышевой линии.

Первую версию VL с привитыми CDR мышиного 231-32-15 получали с использованием человеческого IGKV3-7*02 в качестве акцептора человеческой каркасной области. В различных позициях остатков были учтены обратные мутации, и в результате в каркасной области 3 остаток L87 по Кабату оставляли мышиным, так как он может играть критическую роль на поверхности раздела VH/VL. L87 представляет собой His в мышиной последовательности и Tyr в IGKV3-7*02 человеческой зародышевой линии. Конечная гуманизованная последовательность была названа версией VK A1 (SEQ ID NO: 207) а и имела 81,2% идентичности (82 аминокислотных остатков из 101) с IGKV3-7*02 человеческой зародышевой линии.

Вторую версию VL с привитыми CDR мышиного 231-32-15 получали с использованием человеческого IGKV4-1*01 в качестве акцептора человеческой каркасной области. В различных позициях остатков были учтены обратные мутации, и в результате в каркасной области 3 остаток L87 по Кабату оставляли мышиным, так как он может играть критическую роль на поверхности раздела VH/VL. L87 представляет собой His в мышиной последовательности и Tyr в IGKV4-1*01 человеческой зародышевой линии.

Конечная гуманизованная последовательность была названа версией VK A2 (SEQ ID NO: 208) и имела 91,1% идентичности (92 аминокислотных остатков из 101) с IGKV4-1*01 человеческой зародышевой линии.

В табл. 10 приведены остатки (согласно нумерации Кабата), которые отличаются в каркасных областях мышиного и человеческого антитела в версиях VH и VL с привитыми CDR мышиного 231-32-15, описанных выше.

Таблица 10

Сравнение 231-32-15 и человеческой акцепторной варибельной области тяжелой цепи IGHV1-2*02, и человеческой акцепторной варибельной области легкой цепи IGKV4-1*01, и каркасной области IGKV3-7*02

Варибельная область тяжелой цепи			
Позиция	по	231-32-15	IGHV1-2*02
Кабату			
24		Gly	Ala
48		Ile	Met
67		Ala	Val
71		Val	Arg
73		Lys	Thr
94		Lys	Arg
Варибельная область легкой цепи			
Позиция	по	231-32-15	IGKV4-1*01 / IGKV3-7*02
Кабату			
87		His	Tyr

6.2.3. Экспрессия гуманизированных вариантов

Вариабельные области IGHV1-2*02, IGK4-1*01 и IGK3-7*02 синтезировали при помощи Life Technologies™ и клонировали в стандартные экспрессионные векторы (pPEP), как описано ниже. После этого данные конструкции использовали для трансфекции клеток CHO, а экспрессируемые антитела исследовали при помощи суспензионной матричной технологии (система Luminex® 200, Millipore) и поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®, GE Healthcare), как описано ниже. Термин "вариабельная область" в этом Примере означает перестроенные гены VDJ для тяжелых цепей IGHV1-2*02 и перестроенные гены VJ для легких цепей IGK4-1*01 и IGK3-7*02.

Экспрессионный вектор содержал промотор ЦМВ, константную область иммуноглобулина, элемент WPRE (посттранскрипционный элемент ответа) и сигнал полиаденилирования BGH. Для клонирования вариабельной области IGHV1-2*02 использовали три разных варианта экспрессионного вектора. Два варианта экспрессионного вектора содержали разные константные области иммуноглобулина - IGHG1 и IGHG4, а третий вариант экспрессионного вектора содержал фрагмент IGHG1 для получения Fab-фрагментов антитела. Вариабельные области легких цепей IGK4-1*01 и IGK3-7*02 клонировали в экспрессионный вектор, содержащий константную область иммуноглобулина IGKC.

6.2.3.1. Клонирование в экспрессионные векторы для трансфекции клеток CHO

Синтезированные вариабельные области клонировали в экспрессионный вектор pPEP, содержащий подходящую константную область иммуноглобулина. Для клонирования вариабельных областей тяжелой цепи IGHV1-2*02 конструкции 3592 (pPEP-InsX-Cg(iso3)), 4192 (pPEP-InsX-IgG4) и 4215 (pPEP-InsX-Fab-Xa-6xHis) ("6xHis" раскрыта как SEQ ID NO: 36) расщепляли HindIII/Eco47III при 37°C в течение 4 ч. После расщепления проводили гель-очистку полос с размером 4952 п.о., 4952 п.о. и 4313 п.о. (Macherey & Nagel, NucleoSpin Gel and PCR cleanup). Для клонирования вариабельных областей легкой цепи каппа IGK4-1*01 и IGK3-7*02 конструкцию 3593 (pPEP-Ins-Ck) расщепляли HindIII/Eco47III при 37°C в течение 4 ч и проводили гель-очистку полосы с размером 4474 п.о. Синтезированные вариабельные области антитела расщепляли HindIII/Eco47III при 37°C в течение 4 ч и проводили гель-очистку полос с размером 422 п.о. (IGHV1-2*02) и 411 п.о. (IGK4-1*01 и IGK3-7*02).

Расщепленные и очищенные вариабельные области антител (IGHV1-2*02, IGK4-1*01, IGK3-7*02) лигировали в рамке с векторы pPEP (50 нг), содержащие подходящие константные области иммуноглобулина. Лигирование проводили в течение ночи при 16°C с соотношением предназначенного для вставки вектора 1:3. После этого 1 мкл реакции лигирования электропорировали в клетки DH10B (электрокомпетентные клетки E.coli ElectroMax DH10B, Invitrogen) (1900 В/5 мс). Затем 5-50 мкл электропорированных бактерий высевали в планшеты с LB-агаром + 100 мкг/мл ампициллина. От каждой конструкции получали 2-3 колонии и выращивали в течение ночи.

Из каждого клона получали в небольшом масштабе ДНК-плазмидный препарат (Macherey & Nagel, NucleoSpin Plasmid). Для подтверждения наличия и правильного размера клонированной вставки проводили расщепление HindIII/Eco47III (H/E), а расщепление ApaLI (A) применяли для подтверждения правильного векторного остова. Целостность вектора исследовали путем отделения неразрезанной плазмидной ДНК. Для каждого положительного клона и ДНК проводили масштабирование препарата, контрольное расщепление и секвенирование при помощи праймера 892-Je (последовательность: 5' gaccata-gaaactgggctgtc 3'; SEQ ID NO: 705). Каждой конструкции присваивали уникальный идентификационный номер и готовили глицериновый маточный раствор.

Таблица 11

Характеристики конструкций в экспрессионных векторах

Номер конструкции	Характеристики конструкций	
	Вставка	Константные области иммуноглобулина
4260	IGHV1-2*02	IGHG1
4261	IGK3-7*02	IGKC
4262	IGK4-1*01	IGKC
4379	IGHV1-2*02	IGHG4
4336	IGHV1-2*02	IGHG1-Fab

6.2.3.2. Клонирование в ретровирусные экспрессионные векторы

Вариабельные области IGHV1-2*02, IGK3-7*02 и IGK4-1*01 синтезировали при помощи Life Technologies™ и клонировали в ретровирусные экспрессионные векторы (pCMA). Затем эти конструкции применяли, чтобы трансдуцировать клетки preB и экспрессировать на их поверхности антитела, используя технологию Retrocyte Display®. Ретровирусный экспрессионный вектор содержал 5' и 3' ДКП на основе MSCV, константную область иммуноглобулина (IGHG1 или IGKC), содержащую часть мембранного якоря (IGHG1), и ген поверхностного маркера CD8.

Синтезированные вариабельные области клонировали в ретровирусный экспрессионный вектор, содержащий подходящую константную область иммуноглобулина. Для клонирования вариабельной области тяжелой цепи конструкцию 3956 (pCMA-InsX Cg(iso3) loxP2-I-tr_huCD8-loxP) расщепляли Hin-

dIII/Eco47III при 37°C в течение 4 ч и проводили гель-очистку полосы с размером 7616 п.о. Для клонирования переменных областей легкой цепи каппа конструкцию 3957 (pCMA-InsX Ck-I-tr_huCD8) расщепляли HindIII/Eco47III при 37°C в течение 4 ч и проводили гель-очистку полосы с размером 6718 п.о. Синтезированные переменные области антитела расщепляли, как описано в разделе 6.2.1, выше.

Расщепленные и очищенные переменные области антитела лигировали в рамке в ретровирусные экспрессионные векторы (50 нг), содержащие подходящие константные области иммуноглобулина. Лигирование, трансформацию и подтверждение клонов проводили, как описано в разделе 6.2.3.1, выше. Масштабированные ДНК-плазмидные препараты секвенировали при помощи праймера 327-Je (Последовательность: 5' ctcgacccctcttatccag 3'; SEQ ID NO: 706). Каждой конструкции присваивали уникальный идентификационный номер и готовили глицериновый маточный раствор.

Таблица 12

Характеристики конструкций в ретровирусных экспрессионных векторах

Номер конструкции	Характеристики конструкций		
	Вставка	Константные области иммуноглобулина	Поверхностный маркер
4257	IGHV1-2*02	IGHG1	CD8
4258	IGK3-7*02	IGKC	CD8
4259	IGK4-1*01	IGKC	CD8

6.2.4. Экспрессия рекомбинантных антител

Рекомбинантные антитела экспрессировали посредством временной трансфекции клеток FreeStyleCHO-S (Invitrogen, R800-07) в суспензии. Вкратце, клеточную плотность доводили до 8×10^6 клеток/мл в среде PowerCHO2 (Lonza, 12-771Q), дополненной 4 mM L-глутамин (Biochrom, K 0283) и добавкой 1X HT (GIBCO, 11067-030). ДНК, соответствующую легкой цепи (2,5 мкг/мл) и тяжелой цепи (2,5 мкг/мл) антитела, добавляли в клеточную суспензию с легким перемешиванием. После добавления ДНК клеточную суспензию дополняли 10 мкл/мл трансфекционного реагента TransIT-Pro (MIRUS, MIR5700) и 0,5 mM (конечная концентрация) вальпроовой кислоты (Sigma-Aldrich, P4543). Клеточную суспензию инкубировали в течение 6 дней при 31°C, 8% CO₂ с перемешиванием (200 об/мин).

Культуральный супернатант собирали путем центрифугирования (9000g, 10 мин при 10°C) и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Устройство для ультрафильтрации Vivaspin 20 (Sartorius, VS2032, НОММ 50 кДа) использовали для концентрации супернатанта до конечного объема 0,6 мл при 1000g, 10°C в течение приблизительно 60 мин. Для очистки рекомбинантного антитела колонку с протеином А HP Spin Trap (GE Healthcare, 28-9031-32) уравнивали буфером для связывания (20 mM фосфатный буфер, pH 7,0) и загружали 0,6 мл концентрата. Колонку закрывали крышкой и инкубировали в смесителе вертикального типа при комнатной температуре. Через 30 мин колонку промывали 2х, применяя 600 мкл буфера для связывания, а после этого центрифугировали при 100g в течение 1 мин. Связанное рекомбинантное антитело элюировали из центрифужной колонки путем добавления 400 мкл элюирующего буфера (100 mM глицин, pH 2,0) и центрифугировали при 100g в течение 1 мин. Элюаты немедленно нейтрализовали 40 мкл нейтрализующего буфера (1 M Трис-HCl, pH 9,0). Очищенное рекомбинантное антитело хранили в пробирках для белка LoBind (Eppendorf, 0030 108.116) при 4°C до дальнейшей обработки для исследования характеристик.

Для количественной оценки клеточные культуральные супернатанты и очищенные образцы, содержащие человеческий IgG, разводили в аналитическом буфере (Roche, 11112589001), и проводили оценку разведенных образцов в двух повторностях в 96-полудонорном планшете (Corning, 3884). Вкратце, 25 мкл образцы инкубировали в темноте (20°C, 650 об/мин) в течение 1 ч с 5 мкл 1200 Luminex-COOH-гранул, загруженных путем аминного сопряжения с козым античеловеческим IgG, специфическим к фрагменту F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, 109-006-09). Стандартные кривые получали, используя в двух повторностях по 25 мкл серийных разведений 1:3 (0,08-60 нг/мл) целой молекулы человеческого IgG ChromPure (Jackson ImmunoResearch, 009-000-003). Выявление проводили, добавляя 30 мкл античеловеческого IgG, Fc-специфического меченого R-PE (5 мкг/мл; Jackson ImmunoResearch, 109-116-098), и дополнительно инкубировали в течение 1 ч. Планшеты считывали и анализировали при помощи инструмента Luminex® 200 (Millipore), используя следующие настройки: 100 гранул, объем образца 50 мкл.

Контроль качества очищенных образцов включал анализ методом ДСН-ПААГ и эксклюзионной хроматографии (ЭХ) на ВЭЖХ. Анализ ДСН-ПААГ проводили в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на 12% и 8% полиакриламидных гелях, соответственно, следуя протоколу Laemmli (Laemmli UK (1970) Nature, 227(5259): 680-5). Полиакриламидные гели окрашивали раствором бриллиантового голубого кумасси для визуализации. ЭХ проводили при помощи системы Agilent Infinity 1260 (Agilent Technologies), оборудованной насосом для двухкомпонентных смесей, блоком дегазации, автоматической установки взятия образцов и УФ-диодно-матричным детектором. Для сепарации применяли колонку Zenix-C 300 (размер частиц 3 мкм, 4,5×300 мм, Sepax, 233300-4630). 3 мкг каждого образца загружали в 100 mM фосфатного буфера, pH 7,0 (дополненного 150 mM NaCl) при 0,35 мл/минуту в течение 15 мин, а детекцию проводили на 220 нм.

6.2.5. Характеристики гуманизированных вариантов

Связывающие свойств обоих гуманизированных вариантов (Hum231#1: IGHV1-2*02 и IGHK3-7*02; Hum231#2: IGHV1-2*02 и IGHK4-1*01) и химерного родительского антитела 231-32-15 исследовали несколькими методами анализа, как описано ниже.

6.2.5.1. Количественная оценка и анализ связывания при помощи суспензионной матричной технологии

Очищенный материал обоих гуманизированных вариантов и химерного родительского антитела 231-32-15 разводили в аналитическом буфере (Roche 11112589001) 1:10000 и 1:100000. Вкратце, 25 мкл каждого разведения инкубировали в темноте (20°C, 650 об/мин) с гранулами 1500 Luminex® (в 5 мкл аналитического буфера) в течение 1 ч в 96-полуплуночных фильтровальных планшетах (Millipore, MABVN1250). Гранулы Luminex® (Luminex Corp, # 5 LC10005-01 и # 14 LC10014-01) были сопряжены с античеловеческим IgG (F(ab)₂-специфический, JIR, 105-006-097) или антигеном GITR (R&D systems, дисульфидно-связанный гомодимер; 689-GR) посредством аминного сопряжения с COOH на поверхности гранул. Стандартные кривые для версий IgG1 получали, используя в двух повторностях по 25 мкл целой молекулы IgG ChromPure (JIR, 009-000-003) с серийными разведениями 1:3 (0,08-540 нг/мл). Для антител в формате IgG4 применяли другую стандартную кривую - очищенный иммуноглобулин (Sigma, 14639). Выявление проводили, используя 60 мкл козьего античеловеческого IgG F(ab)₂, меченого R-PE (2,5 мкг/мл; JIR 109-116-098, набор для конъюгации антител AbDSerotec Rapid RPE, LNK022RPE), и 1 час инкубационного времени (20°C, 650 об/мин). Планшеты анализировали при помощи системы Luminex® 200 (Millipore). Подсчитанное число гранул на лунку составило 100 в образце объемом 48 мкл. Относительную аффинность рассчитывали относительно величин СИФ для химерного родительского антитела 231-32-15 (принятую за 100% связывания) и в соответствии с величинами IgG, присутствующими в образце. Оба гуманизированных варианта демонстрировали относительную аффинность, близкую к 100%.

6.2.5.2. Лиганд-блокирующая активность при помощи суспензионной матричной технологии

Чтобы определить, блокируют ли анти-GITR антитела связывание лиганда (GITRL) с GITR, проводили ранжирование при помощи суспензионной матричной технологии. Гранулы 1200 Luminex® в 5 мкл аналитическом буфере (Luminex Corp, #14 LC10014-01) добавляли в каждую лунку 96-луночных планшетов с половинным объемом лунок (Corning, Inc., 3884). Гранулы связывали с антигеном GITR (R&D systems, дисульфидно-связанный гомодимер; 689-GR) посредством аминного сопряжения с COOH на поверхности гранул. Реакцию сопряжения проводили, используя 50 мкг/мл антигена GITR и 1×10^7 гранул Luminex на мл. Для образования карбодиимидных связей между первичными аминными группами антигена и карбоксильными группами на поверхности гранулы использовали стандартный сложный эфир NHS (Luminex Xmap cookbook, глава 3).

Сопряжение антигена с белками представляет собой простую двухэтапную процедуру с участием карбодиимида, во время которой карбоксильные группы на микросферах сначала активируют реагентом ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлоридом) в присутствии сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) для образования промежуточного продукта сульфо-NHS-эфир. Затем реактивный промежуточный продукт замещают реакцией с первичным амином молекулы-мишени (антитела, белка или пептида) для образования ковалентной амидной связи. Сопряженные гранулы инкубировали с разными концентрациями анти-GITR антител (концентрациями от 9000 до 12 нг/мл в 25 мкл аналитического буфера на лунку) в течение 1 ч при 20°C и 650 об/мин. После этого в каждую лунку добавляли по 30 мкл R-PE меченого GITR-лиганда (концентрация 1 нМ; мономерный, R&D systems 694-GF/CF), получая общий объем лунки 60 мкл (1200 гранул на лунку и конечную концентрацию 0,5 нМ меченого GITRL). Мечение лиганда проводили в лаборатории, используя наборы для мечения R-PE (AbDSerotec, набор для конъюгации антител LYNX Rapid RPE, LNK023RPE) в соответствии с протоколом производителя. Планшеты анализировали при помощи системы Luminex® 200 (Millipore). Подсчитанное число гранул на лунку составило 100 в образце объемом 50 мкл. Лиганд-блокирующий потенциал рассчитывали, используя величины СИФ неконкурентного сигнала (100% связывания) содержащего только лиганд контроля. Выявляемый сигнал PE свидетельствовал о связывании лиганда с антигеном.

В первом анализе исследовали анти-GITR антитела - химерное родительское 231-32-15 и m6C8 (WO 06/105021), а также контрольное антитело, распознающее ИЛ-1 β (SK48E26; Международная публикация № WO 95/001997). Антитело m6C8 представляло собой антитело IgG1, полученное на основе вариабельных областей антитела 6C8, приведенных в WO 06/105021 (включенной в данный документ посредством ссылки). Тяжелая цепь m6C8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 585. Легкая цепь m6C8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 586. Результаты этого анализа приведены на фиг. 5, на которой видно, что при концентрациях антитела 6C8 выше 333 нг/мл, сигнал PE не выявлялся и, следовательно, не происходило связывание GITRL с GITR. В противоположность этому в случае химерного родительского антитела 231-32-15 при всех исследуемых концентрациях выявляли сигнал PE, что свидетельствует о том, что GITRL был способен связываться с GITR, когда химерное родительское антитело 231-32-15 также было связано с GITR.

Данные, приведенные на фиг. 5, получены для четырех повторов этого анализа, проводимого в двух

повторностях, а стандартное отклонение рассчитано для $n=8$. Во втором анализе исследовали связывание GITRL-PE с G1TR в присутствии химерного родительского анти-G1TR антитела 231-32-15 и гуманизированных вариантов Hum231#1 и Hum231#2. Фиг. 6 иллюстрирует, что при связывании этих трех анти-G1TR антител с G1TR все еще допускается связывание GITRL с G1TR, а все три антитела демонстрируют сопоставимую лиганд-блокирующую активность.

6.2.5.3. Кинетический анализ методом поверхностного плазменного резонанса

Поверхностный плазмонный резонанс использовали для определения аффинности гуманизированных вариантов и химерного родительского антитела 231-32-15 (система с повышенной чувствительностью BIAcore® T100/T200 (GE Healthcare) и анализ Fab-захвата). Все взаимодействия анализировали при 25°C, используя 1xDPBS (PAA, H15-002) плюс P20 (0,05%, Pierce, 28320) в качестве подвижного буфера. Проводили захват анти-G1TR антител (8 мкг/мл в подвижном буфере) на поверхности сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare, Series S CM5, BR-1005-30) при помощи иммобилизованного античеловеческого антитела к Fab (GE Healthcare, набор для захвата Fab Capture, 28958325). Чтобы выявить неспецифические взаимодействия антигена G1TR, захват антитела проводили только в проточной кювете 2, в то время как в проточной кювете 1 было иммобилизовано только захватывающее антитело. Кроме того, чтобы оценить специфичность связывания G1TR, использовали неродственное антитело (анти-ИЛ-1 β ; SK48E26; Международная публикация № WO 95/001997). После захвата анти-G1TR антител антиген G1TR (R&D systems, дисульфидно-связанный гомодимер; 689-GR) проводили через обе проточные кюветы в разных количествах (40, 10 и 2,5 нМ) для каждого антитела. Также в каждый эксперимент была включена фоновая кривая (только подвижный буфер). Ассоциацию проводили в течение 90 с, а диссоциацию в течение 600 с со скоростью потока 10 мкл/мин. После каждого эксперимента проводили этап восстановления 10 мМ глицина, pH 2,0 (GE Healthcare, BR-1003-55) в течение 60 с при 30 мкл/мин. Кривые связывания оценивали при помощи программного обеспечения BIAcore® T200, версия 2.0.1, применяя лэнгмюровскую 1:1 модель с глобальной аппроксимацией $R_{\text{макс}}$.

Из этих величин рассчитывали величину аффинности (K_d (М)), а сами величины приведены в табл. 13, ниже. Гуманизированные варианты Hum231#1 и Hum123#2 демонстрировали улучшенную скорость ассоциации, но сниженную скорость диссоциации, что отображено в величинах K_d , составляющих 0,7 и 0,6 нМ соответственно. Химерное родительское антитело 231-32-15 имело аффинность 2 нМ.

Таблица 13

Обобщенные результаты по скорости ассоциации и диссоциации
и рассчитанной K_d (М)

анти-G1TR антитело	$K_{\text{асс}} (1/\text{Mc})$	$K_{\text{дисс}} (1/\text{с})$	$K_d (\text{М})$
Химерное родительское 231-32-15	3,52E+05	7,12E-04	2,02E-09
Hum231#1	3,55E+06	2,49E-03	7,02E-10
Hum231#2	2,83E+06	1,78E-03	6,29E-10

6.2.5.4. Анализ блокирования лиганда методом поверхностного плазмонного резонанса

Ожидалось, что оба гуманизированных варианта, Hum231#1 и Hum231#2, будут демонстрировать такую же кинетику блокирования лиганда, что и химерное родительское антитело 231-32-15. Это подтверждали при помощи анализа блокирования лиганда методом поверхностного плазмонного резонанса (система с повышенной чувствительностью BIAcore® T100/T200 (GE Healthcare)).

В первом эксперименте оценивали связывание лиганда G1TR с иммобилизованным антигеном G1TR. Антиген G1TR (R&D systems, дисульфидно-связанный гомодимер; 689-GR) иммобилизовали при высокой плотности (4371 ЕО) на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare, Series S CM5, BR-1005-30). В другой проточной кювете для сравнения был иммобилизован овальбумин (1289 ЕО, Pierce ThermoFisher 77120). Иммобилизацию проводили в соответствии со стандартным протоколом от производителя (GE Healthcare) для аминного сопряжения (активация поверхности 0,4 М ЭДК и 0,1 М NHS, набор для аминного сопряжения GE Healthcare, BR-1000-50). Непрореагировавшие группы инактивировали 1М этанол-амином-HCl, pH 8,5. После этого два лиганда G1TR (мономер R&D, 694-GL и нековалентно связанный гомотример R&D, 6987) проводили через поверхность чипа в разных количествах (500 нМ, 250 нМ и 125 нМ), чтобы определить условия насыщения. Применяли время ассоциации 240 с и время диссоциации 300 с со скоростью потока 5 мкл/мин. Восстановление поверхности чипа проводили, используя 10 мМ глицина, pH 2,0 (GE Healthcare, BR-1003-55) в течение 60 с при 10 мкл/мин. Наиболее благоприятные условия насыщения были достигнуты с тримерным лигандом G1TR при 125 нМ и, следовательно, эту схему использовали с анти-G1TR антителами в таком же количестве. В другом эксперименте использовали обратную схему так, что анти-G1TR антитела (125 нМ) сначала связывались с антигеном G1TR на чипе, а после этого добавляли лиганд G1TR (нековалентно связанный тример при 125 нМ).

Как показано на фиг. 7, когда антиген G1TR был иммобилизован на чипе, а GITRL добавляли в присутствии анти-G1TR антител - химерного антитела 231-32-15, Hum231#1 и Hum231#2, наблюдали связы-

вание GITRL. В противоположность этому, связывание GITRL не наблюдали в присутствии анти-GITR антитела m6C8. Эти данные свидетельствуют о том, что химерное антитело 231-32-15, Hum231#1 и Hum231#2 не ингибируют связывание человеческого GITR с GITRL.

6.3. Пример 3: функциональные характеристики гуманизированных антител

Этот пример демонстрирует способность гуманизированных анти-GITR антител, полученных вышеописанными способами, функционировать в качестве агонистов GITR. Анти-GITR антитело Hum231#2 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 567, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 587. Антитело Hum231#2 является человеческим антителом IgG1, содержащим замену T109S (т.е. замену треонина серином в позиции 109 по сравнению с последовательностью Fc дикого типа) согласно нумерации Кабата в константном домене легкой цепи, которая облегчает клонирование варибельной области в рамке с константной областью. Эта мутация является консервативной модификацией, которая не влияет на связывание или функционирование антитела. Также получали аналог дикого типа под названием Hum231#2w, который содержит треонин в позиции 109 согласно нумерации Кабата. Антитело Hum231#2w является человеческим антителом IgG1, содержащим тяжелую цепь с SEQ ID NO: 567 и легкую цепь с SEQ ID NO: 576.

Эти анти-GITR антитела также анализировали, чтобы определить их способность костимулировать первичные человеческие Т-клетки CD4+ или CD8+. Эту работу, как описано в разделах от 6.3.1 до 6.3.3 иб.3.7, ниже, проводили с материалами от нескольких доноров. Человеческие лейкоциты, используемые в скрининге и исследовании кандидатных антител, были приобретены в Нью-Йоркском центре крови (New York City). Функциональная активность анти-GITR антител была продемонстрирована на обогащенных CD4-положительных (или CD4+) Т-клетках, CD8-положительных (или CD8+) Т-клетках и МКПК. Для исследования пролиферации человеческих Т-клеток собирали свежеприготовленные донорские упакованные лейкоциты и обрабатывали, используя методы стерильного тканевого культивирования. Лейкоциты обрабатывали, чтобы собрать моноклеарные иммунные клетки (МКПК) в градиенте плотности (среда для сепарации лимфоцитов, Corning). МКПК находятся в лейкоцитарной пленке градиента плотности Фиколла.

Обогащенные клетки CD4 получали из МКПК методом негативной селекции, используя коктейль для обогащения человеческих Т-клеток CD4+ RosetteSep® (Stemcell Technologies, Vancouver, BC Canada). Обогащенные препараты Т-клеток CD4+ отделяли от красных кровяных телец центрифугирование в градиенте плотности среды для сепарации лимфоцитов (Corning). Собранные клетки промывали и аликвотировали для хранения в жидком азоте. Чтобы учесть вариабельность в ответе донора на стимуляцию, применяли варьирующиеся концентрации анти-CD3 для корректировки донор-специфической способности к ответу. Следовательно, перед проведением скрининга анти-GITR антител лейкоцитарные пленки оценивали в отношении способности высвобождать цитокины и пролиферировать в ответ на стимуляцию CD3 с титрованными уровнями анти-CD3 (клон SP34; BD Pharmingen; концентрация в диапазоне от 31,5 до 250 нг/мл) с или без стандартного анти-GITR химерного родительского антитела 231-32-15, чтобы установить базовый уровень Т-клеточной пролиферации и выработки цитокинов и определить подходящие условия стимуляции для каждой донорной лейкоцитарной пленки.

6.3.1. Влияние агонистических анти-GITR антител на стимулируемую анти-CD3 пролиферацию Т-клеток CD4+

Анти-GITR антитела оценивали в отношении агонистической активности путем костимуляции Т-клеток CD4+. Агонистическую активность химерного родительского антитела 231-32-15 сравнивали с двумя гуманизированными версиями: Hum231#1 и Hum231#2. Анализ костимуляции проводили следующим образом: в случае условий стимуляции со связанным с планшетом антителом анти-CD3 антитела, анти-GITR антитела и, где указано, изотипический контроль наносили на плоскодонные или круглодонные стерильные планшеты для тканевого культивирования в течение 2 ч, а излишек антител удаляли путем промывки. В случае условий стимуляции с растворимым антителом анти-CD3 антитело наносили на планшет, в то время как костимуляцию анти-GITR антителами проводили в растворе. Исследуемыми анти-GITR антителами были Hum231#1 и Hum231#2, химерное родительское антитело 231-32-15 (или REF-231) или отрицательные изотипические контроли (pAB1915). Кроме того, в случае условий стимуляции со связанным с планшетом и растворимым антителом анти-CD28 антитело (125 нг/мл; BD Pharmingen) и 10U ИЛ-2 также находились в растворе. Клеточную пролиферацию определяли, отслеживая растворение красителя сукцинимидилового сложного эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) в поделенных клетках (Quah BJ et al. (2007) Nat Protoc, 2(9): 2049-56). Обогащенные Т-клетки CD4+ метили 1-2 мкМ CFSE. CFSE-меченные обогащенные Т-клетки CD4+ промывали, а затем стимулировали связанным с планшетом анти-CD3 (125 нг/мл), растворимым анти-CD28 (125 нг/мл) и 10 Е ИЛ-2 вместе с 5 мкг/мл или 10 мкг/мл связанных с планшетом анти-GITR антител или без антитела. Клетки оставляли для деления на 3-6 дней в культуре при 37°C в зависимости от оптимальной активации каждой донорной клетки, когда с планшета собирали культуральные супернатанты и клетки.

Фиг. 8А и 8В иллюстрируют типовой анализ FACS пролиферации Т-клеток CD4+, индуцированной костимуляцией анти-GITR антителами, проводимый в трех повторностях с лейкоцитарной пленкой 6 и лейкоцитарной пленкой 8 соответственно. На этих фигурах показано число клеток (ось Y) и уровень

флуоресценции (ось X), испускаемой мечеными CFSE Т-клетками CD4⁺. Использовали 10 мкг/мл анти-GITR антител (химерное родительское 231-32-15 (REF 231-32-15), Hum231#1 и Hum231#2). Повышенную пролиферацию Т-клеток CD4⁺ отображает повышенное процентное содержание клеток со сниженным уровнем флуоресценции, испускаемой CFSE (низк. CFSE). Фиг. 8А и 8В иллюстрируют, что анти-GITR антитела (химерное родительское 231-32-15 (REF 231-32-15), Hum231#1 и Hum231#2) демонстрируют агонистическую активность при добавлении к клеткам, активированным субоптимальными концентрациями анти-CD3 антитела в случае как клеток с высоким уровнем ответа (лейкоцитарная пленка 6, фиг. 8А), так и клеток с низким уровнем ответа (лейкоцитарная пленка 8; фиг. 8В).

На фиг. 9А и 9В представлены гистограммы по типовым результатам вышеприведенного исследования для связанных с планшетом анти-GITR антител (химерное родительское антитело 231-32-15, Hum231#1, Hum231#2 и m6C8) в концентрации 10 мкг/мл. В примере, проиллюстрированном на фиг. 9А, костимуляция Hum231#1 или Hum231#2 индуцировала пролиферацию Т-клеток CD4⁺ при 10 мкг/мл. Пролиферировало приблизительно более 50% Т-клеток CD4⁺ (клетки с низким CFSE) при костимуляции 10 мкг/мл Hum231#1 или Hum231#2. В противоположность этому, после стимуляции анти-CD3/анти-CD28 без анти-GITR антитело-опосредованной стимуляции пролиферировало только приблизительно 35% Т-клеток CD4⁺ (клетки с низким CFSE). Фиг. 9В иллюстрирует, что добавление костимуляции анти-GITR к анти-CD3/анти-CD28-опосредованной стимуляции также приводило к повышению абсолютного числа Т-клеток CD4⁺ в культуре через 5 дней по сравнению со стимуляцией только анти-CD3/анти-CD28. Например, стимуляция анти-CD3/анти-CD28 в сочетании с 10 мкг/мл химерного родительского антитела 231-32-15 (REF 231) приводила к костимуляции GITR, индуцированной экспансией числа Т-клеток CD4⁺ от $7,5 \times 10^4$ до $12,0 \times 10^4$. Кроме того, Hum231#1 - опосредованная костимуляция при 10 мкг/мл также индуцировала экспансию Т-клеток CD4⁺ от $7,5 \times 10^4$ до $11,5 \times 10^4$. При концентрации антитела 10 мкг/мл костимуляция Hum231#2 также индуцировала пролиферацию Т-клеток CD4⁺ от $7,5 \times 10^4$ до $10,6 \times 10^4$. Следует отметить, что костимуляция Т-клеток CD4⁺ 10 мкг/мл m6C8 (Международная публикация №: WO 06/105021) не приводила к дополнительному повышению абсолютного числа клеток через 5 дней культивирования, превышающему наблюдаемое при стимуляции только анти-CD3/анти-CD28.

6.3.2. Влияние агонистических анти-GITR антител на индуцированную анти-CD3 выработку цитокинов Т-клетками CD4⁺

В качестве дополнительного доказательства агонистической костимулирующей активности анти-GITR антител определяли уровень цитокинов (ИФН γ , ИЛ-6, ФНО α и ИЛ-10), высвобождаемых Т-клетками CD4⁺, при помощи мультиплексного анализа ELISA (Flowcytomix, анализ ELISA для цитокинов на основе гранул FACS, eBioscience). Супернатанты, собранные при проведении анализа пролиферации, использовали для анализа цитокинов. Фиг. 10А-10D иллюстрируют влияние 10 мкг/мл или 5 мкг/мл химерного родительского 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 анти-GITR антител на выработку цитокинов человеческими Т-клетками CD4⁺. Добавление 10 мкг/мл или 5 мкг/мл химерного родительского антитела 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 к стимулированным анти-CD3/анти-CD28 Т-клеткам существенно повышало выработку ИФН γ , ФНО α , ИЛ-10 и ИЛ-6 по сравнению со стимуляцией только анти-CD3/анти-CD28.

Для агонистических анти-GITR антител в отсутствие стимуляции анти-CD3/анти-CD28 агонистическую активность не наблюдали.

6.3.3. Титрование гуманизированных клонов 231-32-15

Чтобы оценить диапазон концентраций анти-GITR антитела, которые индуцируют пролиферацию Т-клеток и выработку цитокинов, обогащенные Т-клетки CD4⁺ стимулировали 125 нг/мл анти-CD3/анти-CD28 и костимулировали титрованными связанными с планшетом химерным родительским 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 анти-GITR антителами. Результаты, приведенные на фиг. 11, свидетельствуют, что стимуляция химерным родительским 231-32-15, Hum231#1 и Hum231#2 в концентрации 10 мкг/мл, 5 мкг/мл или 2,5 мкг/мл индуцирует пролиферацию Т-клеток согласно данным по разбавлению CFSE. Кроме того, в отсутствие какой-либо стимуляции анти-CD3/анти-CD28 анти-GITR антитела не стимулировали пролиферацию Т-клеток CD4⁺. Фиг. 12А иллюстрирует, что стимуляция анти-CD3/анти-CD28 и костимуляция анти-GITR антителами (химерным родительским 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2) в определенном диапазоне концентраций (10, 5 или 2,5 мкг/мл) повышала выработку Т-клетками CD4⁺ ИФН γ . Следует отметить, что в отсутствие стимуляции анти-CD3/анти-CD28 анти-GITR антитела (химерное родительское 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2) не индуцировали выработку ИФН γ .

Чтобы дополнительно изучить функциональную активность химерного родительского 231-32-15, Hum231#1 или Hum231#2 анти-GITR антител в растворе, обогащенные Т-клетки CD4⁺ стимулировали 125 нг/мл анти-CD3/анти-CD28 и костимулировали титруемыми растворимыми анти-GITR антителами. Растворимые Hum231#1 или Hum231#2 анти-GITR антитела также костимулировали выработку Т-клетками CD4⁺ ИФН γ , как показано на фиг. 12В.

6.3.4. Влияние агонистического анти-GITR антитела на индуцированную анти-CD3 выработку цитокинов МКПК

В этом примере выработку цитокинов, индуцированную костимуляцией анти-GITR антителом Hum231#2, исследовали, используя МКПК. МКПК, выделенные при помощи градиента фиколла из лейкоцитарных пленок от здоровых доноров (Research Blood Components, LLC), хранили в жидком азоте и размораживали в день эксперимента. Клетки пересуспендировали в клеточной культуральной среде (RPMI + 10% ФБС + 20 Е/мл ИЛ-2) и добавляли в 96-луночные культуральные планшеты, которые содержали связанное с планшетом анти-CD3 антитело в различных субоптимальных концентрациях (0,3-5 мкг/мл) и 5 мкг/мл связанного с планшетом анти-GITR антитела или изотипического контрольного антитела IgG1. Образцы инкубировали в течение 4 дней при 37°C и 5% CO₂, а клеточные культуральные супернатанты собирали на 2 день и на 4 день. Чтобы измерить уровни секретированных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α , ИЛ-10, ИЛ-13 и ИЛ-4), образцы исследовали, используя набор V-PLEX Proinflammatory Panel1 (челов.) Kit (Meso Scale Discovery), в соответствии с инструкциями производителя. Как проиллюстрировано на фиг. 13, костимуляция связанным с планшетом анти-GITR антителом Hum231#2 индуцировала секрецию разных цитокинов в МКПК от двух разных доноров.

6.3.5. Влияние агонистических анти-GITR антител на выработку цитокинов, оцененное методом внутриклеточного окрашивания цитокинов

Агонистическое действие Hum231#2 на выработку цитокинов дополнительно анализировали методом внутриклеточного окрашивания цитокинов. МКПК, выделенные при помощи градиента фиколла из лейкоцитарных пленок от здоровых доноров (Research Blood Components, LLC), хранили в жидком азоте и размораживали в день эксперимента. Клетки пересуспендировали в клеточной культуральной среде (RPMI + 10% ФБС + 20 Е/мл ИЛ-2) и добавляли в 96-луночные культуральные планшеты, которые содержали связанное с планшетом анти-CD3 антитело в различных субоптимальных концентрациях (0,3-5 мкг/мл) и 5 мкг/мл связанного с планшетом анти-GITR антитела или изотипического контрольного антитела IgG1. Образцы инкубировали в течение 3-4 дней при 37°C и 5% CO₂. После активации, чтобы ингибировать внутриклеточный транспорт белка, клетки обрабатывали брэфелдином А (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали образцы в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂. После инкубации клетки окрашивали активным в отношении аминов красителем ФИТЦ (Life technologies), чтобы окрасить мертвые клетки. После промывки охлажденным буфером FACS (1xPBS+2% ФБС, pH 7,2) коктейль из антител, содержащий антитела против CD3 (APC Cy7, SP34.2), CD4 (PercP Cy5.5, L200) и CD8a (PE Cy7, SK1), разведенные в охлажденном буфере FACS, добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Клетки фиксировали и пермеабелизировали при помощи Cytofix-Сytoperm (BD Biosciences) для внутриклеточного окрашивания в соответствии с инструкциями производителя. МКПК окрашивали антителами против ИФН γ (Alexa647, B27) и ФНО α (PE, Mab11) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Образцы промывали, используя 1x промывочный буфер Perm (BD Biosciences), и проводили выявление, используя проточный цитометр FACScanto (BD Biosciences). Данные проточной цитометрии анализировали при помощи программного обеспечения FloJo. Данные и графики по проточной цитометрии являются репрезентативными по экспериментам с МКПК от шести разных доноров.

Антитело к GITR Hum231#2 демонстрировало костимулирующую активность на человеческие Т-клетки, индуцируя ИФН γ + монофункциональные Т-клетки, ФНО α + монофункциональные Т-клетки, а также ИФН γ + ФНО α + полифункциональные Т-клетки в диапазоне субоптимальных концентраций анти-CD3 антитела (фиг. 14А и 14В). Далее, Hum231#2w, которое является человеческим антителом IgG1, преобразовывали в человеческое антитело IgG4 под названием rab1989. Антитело rab1989 имеет такую же вариабельную область тяжелой цепи и такую же легкую цепь, что и Hum231#2w, но содержит константную область человеческого IgG4. Антитело rab1989 содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 554 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 576.

Антитело IgG4 rab1989 исследовали в параллели с антителом IgG1 Hum231#2w в описанном выше эксперименте по внутриклеточному окрашиванию цитокинов. The анти-CD3 антитело применяли при 0,7, 0,8 и 0,9 мкг/мл, а анти-GITR антитела при 5 мкг/мл. Образцы инкубировали в течение 3-4 дней при 37°C и 5% CO₂. Как показано на фиг. 14С, rab1989 проявлял такую же агонистическую активность, что и Hum231#2w, индуцируя ИФН γ + ФНО α + полифункциональные Т-клетки CD4+ и ФНО α + монофункциональные Т-клетки CD4+. Графики являются репрезентативными по экспериментам с МКПК от четырех разных доноров.

6.3.6. Влияние перекрестного связывания на агонистическую активность анти-GITR антитела

Влияние перекрестного связывания на функциональную активность анти-GITR антитела Hum231#2 исследовали, используя стимулированные анти-CD3 МКПК. Связанное с планшетом или растворимое Hum231#2 исследовали в отношении индукции ИФН γ + ФНО α + полифункциональных Т-клеток в анализе субоптимальной стимуляции CD3, как описано в разделе 6.3.5. Как показано на фиг. 15А, только связанное с планшетом, но не растворимое Hum231#2 повышало процентное содержание ИФН γ + ФНО α + полифункциональных Т-клеток CD8+ по сравнению с изотипическим контролем.

Анализ секреции цитокинов МКПК, описанный в разделе 6.3.4, повторяли для связанных с планшетом Hum231#2 или Hum231#2, перекрестно связанных с анти-Fc антителом. Культуральный супернатант собирали на 4 день для измерения уровня секретированных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α , ИЛ-10, ИЛ-13 и ИЛ-4). Костимуляция связанным с планшетом (фиг. 15B) или перекрестно связанным с анти-Fc (фиг. 15C) Hum231#2 индуцировала секрецию цитокинов.

6.3.7. Действие гуманизированных клонов 231-32-15 на лейкоцитарную пленку 8 (BC8) и измерение эффекторных Т-клеток или регуляторных Т-клеток

В этом примере действие агонистических анти-GITR антител на эффекторные Т-клетки CD4⁺ или регуляторные Т-клетки CD4⁺ определяли по их пролиферации. Обогащенные Т-клетки CD4⁺ метили CFSE и стимулировали 125 нг/мл связанного с планшетом анти-CD3 антитела. Пролиферацию обогащенных Т-клеток CD4⁺ отслеживали по разбавлению CFSE через 5 дней культивирования.

Популяцию эффекторных или регуляторных Т-клеток CD4⁺ в популяции обогащенных Т-клеток CD4⁺, показанную на Фигурах 16A и 16B, определяли методом проточной цитометрии с применением окрашивания по маркерам клеточной поверхности. Активированные эффекторные клетки CD4⁺ были определены как CD25⁺, CD45RA⁻, CD127^{Сред/Низк} и Foxp3^{Отриц/Низк}. Регуляторные Т-клетки CD4⁺ были определены как CD4⁺, CD25⁺, CD45RA⁻, CD127^{Низк} и Foxp3^{Высок}. Окрашивание FACS проводили в соответствии с табл. 14.

Таблица 14

Панель окрашивания FACS

Канал	Лазер	Стандартный флуорохром	Антиген/ флуорохром
1	Синий 488 нм	ФИТЦ, AF488, 3ФБ	CFSE
2	Синий 488 нм	PE	CD127
6	Синий 488 нм	Pe-Cy7	CD45RA
7	Красный 633 нм	APC	GITR APC
9	Красный 633 нм	APC-Cy-7, APC-H7	CD25-APC-H7
10	Фиолетовый 405 нм	DAPI, Pac Blue, V450	FoxP3 e450
11	Фиолетовый 405 нм	AF430, AmCyan, V500	L/D

Результаты анализа стимуляции показаны на графиках FACS на фиг. 16A и 16B. Гейтинг на CD4⁺ Treg (CD4⁺, CD25⁺, CD45RA⁻, CD127^{Низк} и Foxp3^{Высок}) или активированных эффекторных клетках CD4⁺ (CD25⁺, CD45RA⁻, CD127^{Сред/Низк} и Foxp3^{Отриц/Низк}) показывает, что стимуляция одним 125 нг/мл анти-CD3/анти-CD28 и в сочетании с костимуляцией анти-GITR повышает экспрессию GITR как на эффекторных Т-клетках, так и на регуляторных Т-клетках.

Фиг. 16A иллюстрирует анализ FACS для эффекторных Т-клеток и регуляторных Т-клеток. Оба типа клеток экспрессировали на своей поверхности GITR после стимуляции одним анти-CD3 или в сочетании с анти-GITR антителами. При этом костимуляция анти-GITR антителами приводила к преимущественной экспансии эффекторных Т-клеток над регуляторными Т-клетками, что приводило к повышению соотношения Teff/Treg (фиг. 16B).

В качестве дополнительного доказательства агонистического действия анти-GITR антител на Т-клетки в контексте клеточного иммунитета оценивали ответы Т-клеток после стимуляции МКПК.

Стимуляцию МКПК титровали путем корректировки анти-CD3-индуцированной пролиферации в отношении МКПК. На фиг. 17A и 17B проиллюстрированы CFSE-меченые МКПК, которые стимулировали 31,25 нг/мл связанного с планшетом анти-CD3/ анти-CD28 в сочетании со связанными с планшетом анти-GITR антителами или изотипическим контролем. В качестве положительного контроля активности анти-GITR антител применяли те же условия стимуляции, чтобы стимулировать обогащенные Т-клетки CD4⁺ (данные не показаны).

Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺ в популяции МКПК определяли по окрашиванию анти-CD3 и анти-CD4 или анти-CD3 и анти-CD8. Анализ FloJo (Tree Star, Inc.) полученных образцов FACS, гейтированных на Т-клетках CD4⁺CD3⁺ или Т-клетках CD8⁺CD3⁺, показал, что анти-GITR химерное родительское антитело 231-32-15 (REF 231) и антитела Hum231#1 и Hum231#2 стимулировали пролиферацию Т-клеток (% низк. CFSE). В частности, эксперимент, проиллюстрированный на фиг. 17B, выявил, что анти-GITR химерное родительское антитело 231-32-15 (REF 231) и антитела Hum231#1 и Hum231#2 оказывают действие на Т-клетки CD8⁺.

6.3.8. Влияние агонистических анти-GITR антител на репортерную линию клеток GITR NF- κ B-люцифераза

Человеческую репортерную линию клеток GITR NF- κ B-люцифераза (Promega) конструировали, чтобы исследовать костимулирующую активность анти-GITR агонистических антител. Сообщалось, что активация GITR анти-GITR агонистическим антителом или лигандом GITR активирует NF- κ B (Snell LM et al. (2010) J Immunol 185: 7223-7234; Bulliard Y et al. (2013) J Exp Med 210: 1685-1693; Yu KY et al.

(2003) *Biochem Biophys Res Commun* 310: 433-438). Следовательно, клетки Jurkat генетически модифицировали так, чтобы они стабильно экспрессировали конструкцию GloResponse NF- κ B-luc2P и человеческий GITR. Репортерные клетки пересуспендировали в аналитической среде (RPMI + 1% ФБС) и инкубировали с различными концентрациями (12,5, 10, 5, 2,5, 1,25 и 0,625 мкг/мл) связанных с планшетом анти-GITR антител Hum231#2w, m6C8 или изотипического контрольного IgG1 в отсутствие или присутствии 0,3 мкг/мл связанного с планшетом анти-CD3 антитела (клон SP34). Планшеты, которые инкубировали с анти-CD3 антителом, считывали через 6 или 18 ч инкубации. Планшеты без анти-CD3 антитела считывали через 2, 5, 6, 8 или 18 ч инкубации. После инкубации планшеты уравнивали при комнатной температуре, а затем добавляли эквивалентный объем реагента Bio-Glo (Promega) при комнатной температуре. Люминесценцию считывали, используя мультиметочный ридер EnVision 2100. В случае анализа с анти-CD3 антителом для каждой исследуемой концентрации антитела строили график ОСЕ люциферазы через 18 ч после стимуляции (фиг. 18А). Аналогично, в случае анализа без анти-CD3 антитела на фиг. 18В представлен график, иллюстрирующий относительные световые единицы (ОСЕ) для люциферазы через 5 ч после стимуляции для различных исследуемых концентраций антитела. На фиг. 18С показаны наибольшие соотношения экспрессии люциферазы (GITR Ab/изотипический контроль) без анти-CD3 антитела для нескольких исследуемых концентраций антитела через 0, 2, 5, 6, 8 и 18 ч после стимуляции. Приведенные данные являются репрезентативными по четырем экспериментам с анти-CD3 антителом и двум экспериментам без анти-CD3 антитела.

В случае присутствия анти-CD3 антитела, хотя m6C8 и демонстрировал большую агонистическую активность через 6 ч (данные не показаны), через 18 ч после стимуляции Hum231#2w и m6C8 индуцировали одинаковую активацию репортерной линии клеток GITR (фиг. 18А). При этом в отсутствие анти-CD3 антитела только Hum231#2w, но не m6C8 индуцировало активацию репортерной линии клеток GITR (фиг. 18В).

6.3.9. Влияние агонистического анти-GITR антитела на репортерную линию клеток Fc-гамма-рецептора IIIA (CD16)

В этом примере исследовали экспрессию человеческого GITR активированными клетками nTreg и эффекторными Т-клетками. МКПК, полученные от здоровых доноров, обогащали Т-клетками CD3+ (Teff) или Т-клетками CD4+CD25+CD45RA+ (nTreg), используя сепарацию в магнитном поле. Затем Т-лимфоциты активировали при помощи гранул для экспансии CD3-CD28 с 500 Е г-ИЛ-2 в течение 4 дней и 50 Е г-ИЛ-2 в течение дополнительных 5 дней. Количественную оценку рецепторов GITR проводили методом проточной цитометрии с гейтингом на CD4+ и CD8+ Teff против nTreg. Одновременно проводили эксперимент с гранулами Quantibrite (BD Biosciences), которые использовали для оценки поверхностной плотности рецепторов GITR.

Как показано на фиг. 19А, поверхностная экспрессия человеческого GITR на активированных клетках nTreg на 9 день (и во все оцениваемые временные точки) была выше, чем на активированных эффекторных Т-клетках CD4+ или CD8+. Далее оценивали способность анти-GITR антитела Hum231#2w совместно задействовать GITR и сигнализацию посредством активации Fc-гамма-рецепторов при помощи репортерной линии клеток, экспрессирующей Fc-гамма-рецептор IIIA (CD16) вместе с активированными эффекторными Т-клетками (Teff) или клетками nTreg, полученными как описано. Экспандированные клетки Teff или nTreg инкубировали с разными дозами Hum231#2w или изотипического контрольного IgG1. Репортерные клетки Jurkat NFAT-люцифераза, сверхэкспрессирующие CD16 (полиморфизм 158 V/V) добавляли в образцы. Связывание комплекса антитело/антиген, когда антиген расположен на клеточной поверхности, с CD16 передает сигнал промоторной/репортерной конструкции и приводит к транскрипции гена люциферазы. Планшеты инкубировали в течение 20 ч при 37°C и 5% CO₂. После инкубации реагент для анализа люциферазы Bio-Glo (Promega) размораживали при комнатной температуре и добавляли по 75 мкл в каждую лунку 96-луночных белых аналитических планшетов. В течение 5-10 мин измеряли люминесценцию. Из показаний для каждого образца вычитали фоновую люминесценцию и записывали скорректированные относительные световые единицы (ОСЕ). А ОСЕ представляет ОСЕ анти-GITR антитела минус данные по изотипическому контролю.

В соответствии с разной поверхностной экспрессией GITR для активированных nTreg и активированных эффекторных Т-клеток CD4+ или CD8+ (фиг. 19А), анти-GITR антитело Hum231#2w преимущественно активирует CD16 при связывании с активированными клетками nTreg (фиг. 19В).

Чтобы оценить, была ли сверхэкспрессия GITR характерным признаком регуляторных Т-клеток, находящихся в опухолевом микроокружении, сравнивали экспрессию GITR на Т-клетках, полученных от здоровых человеческих доноров (фиг. 19С, а-с, n=3) или из опухолевых тканей пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ) (фиг. 19С, d-f, n=3). Чтобы исключить фоновое связывание антител с популяциями иммунных клеток, все клетки инкубировали с очищенным антителом к CD16/32 (10 мкг/мл, 20 мин при комнатной температуре) перед добавлением клеточно-поверхностных и внутриклеточных антител. После FcR-блокады все образцы инкубировали с APC-конъюгированным анти-GITR антителом (клон 110416, R&D systems) или изотипическим контролем и коктейлем линий дифференцировки клеточно-поверхностных антител (CD3-FITC, CD25-PECy7, CD4-BV650 и CD8a-PE) в течение 45 мин на льду (1 мкг/мл каждого), промывали три раза буфером FACS (PBS, ЭДТУ и 0,5% БСА), после

чего фиксировали/пермеабилizировали и инкубировали с Pacific Blue-конъюгированным FOXP3 (фикс/перм и инкубировали каждые 45 мин на льду, 1 мкг/мл). Затем окрашенные образцы анализировали, используя проточный цитометр LSRFortessa (BD Biosciences). Популяции клеток на фиг. 19C были определены следующим образом: Tconv (CD3+, CD4+, CD8a-, CD25низк, FOXP3-) или Treg (CD3+, CD4+, CD8a-, CD25высок, FOXP3+).

Как продемонстрировано на фиг. 19C, поверхностная экспрессия GITR была самой высокой на регуляторных Т-клетках, выделенных из опухолевых тканей пациентов с НМКРЛ, а ее уровень на клетках Treg или традиционных Т-клетках от здоровых доноров был мал или не выявляем.

6.3.10. Влияние агонистического анти-GITR антитела на выработку цитокинов Т-клетками африканской зеленой мартышки

Чтобы исследовать межвидовую перекрестную реактивность, Hum231#2 оценивали в отношении связывания с GITR от африканской зеленой мартышки (АЗМ). Вкратце, МКПК АЗМ (Worldwide Primates) размораживали и подсчитывали. МКПК пересуспендировали в клеточной культуральной среде (RPMI + 10% ФБС) и стимулировали анти-CD3 антителом (клон SP34.2, BD) или ConA (Sigma) плюс ИЛ-2 (20 Е/мл) в течение 3 дней при 37°C и 5% CO₂. После активации клетки окрашивали активным в отношении аминов ФИТЦ (Life technologies) в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки промывали охлажденным буфером FACS (1 X PBS + 2% ФБС, pH 7,2), добавляли коктейль из антител, разведенный в охлажденном буфере FACS, содержащем антитела против CD3 (APC Cy7, SP34.2), CD4 (PercP, L200), CD8 (PE Cy7, SK1) и PD-1 (PE, EH12.2H7), и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Клетки промывали и инкубировали с 2,5 мкг на лунку Hum231#2 или изотипического контрольного IgG1 в течение 10 мин при 4°C. Клетки промывали, а затем окрашивали вторичным анти-Fc F(ab')₂ антителом, конъюгированным с Alexa647, в течение 10 мин при 4°C. Клетки промывали и фиксировали 1,6% параформальдегидом перед исследованием на проточном цитометре FACSCanto (BD Biosciences). Данные FACS анализировали при помощи программного обеспечения FACS DIVA.

Как показано на фиг. 20A, анти-GITR антитело Hum231#2 связывается с активированными Т-клетками CD4+ и CD8+ АЗМ. Нестимулированные Т-клетки от АЗМ не экспрессируют базовые уровни GITR, а уровни GITR на клеточной поверхности повышаются после активации Т-клеток. Графики, приведенные на фиг. 20A, являются репрезентативными по экспериментам с МКПК от трех разных АЗМ.

Далее проводили анализ субстимуляции CD3 с МКПК от африканской зеленой мартышки (АЗМ), чтобы исследовать агонистическую активность Hum231#2w. МКПК человека (Research Blood Components, LLC) или АЗМ (Worldwide Primates) получали от здоровых доноров при помощи градиента фикола и хранили в жидком азоте, и размораживали в день эксперимента. Клетки пересуспендировали в клеточной культуральной среде (RPMI + 10% ФБС + 20 Е/мл ИЛ-2) и добавляли в 96-луночные культуральные планшеты, которые содержали связанное с планшетом анти-CD3 антитело (0,8 мкг/мл) и различные концентрации (2, 4, 5, 6 и 9 мкг/мл) связанного с планшетом анти-GITR антитела или изотипического контрольного антитела IgG1. Образцы инкубировали в течение 4 дней при 37°C и 5% CO₂. После активации, чтобы ингибировать внутриклеточный транспорт белка, клетки обрабатывали брэфелдином А (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали образцы в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂. После инкубации клетки окрашивали активным в отношении аминов красителем ФИТЦ (Life technologies), чтобы окрасить мертвые клетки. После промывки охлажденным буфером FACS (1xPBS + 2% ФБС, pH 7,2) коктейль из антител, содержащий антитела против CD3 (APC Cy7, SP34.2), CD4 (PercP Cy5.5, L200) и CD8a (PE Cy7, SK1), разведенные в охлажденном буфере FACS, добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Клетки фиксировали и пермеабилizировали при помощи Cytofix-Cytoperm (BD Biosciences) для внутриклеточного окрашивания в соответствии с инструкциями производителя. МКПК окрашивали антителами против ИФН γ (Alexa647, B27) и ФНО α (PE, Mab11, только для человеческих МКПК) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Образцы промывали, используя 1x промывочный буфер Perm (BD Biosciences), и проводили выявление, используя проточный цитометр FACSCanto (BD Biosciences). Данные проточной цитометрии анализировали при помощи программного обеспечения Flojo.

Как показано на фиг. 20B и 20C, костимуляция анти-GITR антителом Hum231#2w индуцирует выработку ИФН γ Т-клетками CD8+ АЗМ. Данные и графики по проточной цитометрии являются репрезентативными по экспериментам с МКПК от двух АЗМ.

6.3.11. Влияние одновременного связывания рекомбинантного человеческого лиганда GITR и гуманизированных клонов 231-32-15 на стимулированных анти-CD3 Т-клетках CD4+

Агонистическое анти-GITR антитело, которое не предотвращает связывание GITR с лигандом GITR (GITRL), может приводить к усиленному иммунному ответу, характеризующемуся повышением пролиферации и/или эффекторной функции эффекторных Т-клеток и/или снижением супрессивной функции регуляторных Т-клеток. Анти-GITR антитела, как одни, так и в комбинации с рекомбинантным человеческим GITRL, исследуют в отношении агонистического действия на Т-клетки CD4+. Обогащенные Т-клетки CD4+ метят 1-2 мкМ CFSE, промывают, а затем стимулируют связанным с планшетом анти-CD3 (125 нг/мл), растворимым анти-CD28 (125 нг/мл) и 10 Е ИЛ-2 вместе с 10 мкг/мл химерного родительского

антитела 231-32-15, 10 мкг/мл Hum231#1, 10 мкг/мл Hum231#2, 10 мкг/мл GITRL, комбинацией из 10 мкг/мл химерного родительского антитела 231-32-15 с 10 мкг/мл GITRL, комбинацией из 10 мкг/мл Hum231#1 с 10 мкг/мл GITRL или комбинацией из 10 мкг/мл Hum231#2 с 10 мкг/мл GITRL при 37°C в течение 3-6 дней. Затем культуральные супернатанты и клетки собирают с планшетов. Проллиферацию клеток и высвобождение цитокинов исследуют, как описано в разделах 6.3.1 и 6.3.2 соответственно. Влияние одновременного связывания анти-GITR антител и GITRL на эффекторные Т-клетки CD4⁺ или регуляторные Т-клетки CD4⁺ можно дополнительно исследовать, как описано в разделе 6.3.7. Это исследование может продемонстрировать синергетический или аддитивный эффект GITRL и анти-GITR антител (химерного родительского 231-32-15, Hum231#1 и Hum231#2) в усилении иммунных ответов.

В качестве альтернативы применению растворимого рекомбинантного человеческого GITRL для исследования совместной агонистической активности в комбинации с описанными в данном документе анти-GITR антителами, можно применять антигенпрезентирующие клетки, которые индуцируют для экспрессии GITRL. Такие индуцированные АПК можно культивировать с эффекторными Т-клетками CD4⁺ или регуляторными Т-клетками CD4⁺, как описано выше, в присутствии или отсутствии анти-GITR антител, и оценивать функцию Т-клеток. Чтобы индуцировать экспрессию GITRL, антигенпрезентирующие клетки, такие как макрофаги или дендритные клетки, инкубируют с лигандом TLR4 (например, LPS) в течение 1, 2, 4, 6 или 12 ч, как описано, например, в Tone M et al. (2003) PNAS 100: 15059-15064; или с целыми частицами Р-гликанов (WGP), выделенными из клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae*, в течение 6, 12, 24, 48 или 72 ч, как описано, например, в Tian J et al. (2012) PLoS One, 7(10): e46936.

6.3.12. Влияние агонистического анти-GITR антитела на поверхностную экспрессию OX40 и PD-1 на Т-клетках

В этом примере агонистическое анти-GITR антитело оценивали в отношении его влияния на поверхностную экспрессию OX40 и PD-1 на Т-клетках. МКПК, полученные при помощи градиента фикола из лейкоцитарных пленок от здоровых доноров (Research Blood Components, LLC), и хранили в жидком азоте и размораживали в день эксперимента. Клетки пересуспендировали в клеточной культуральной среде (RPMI + 10% ФБС + 20 Е/мл ИЛ-2) и добавляли в 96-луночные культуральные планшеты, которые содержали связанное с планшетом анти-CD3 антитело (клон SP34) в различных субоптимальных концентрациях (0, 0,7, 0,8 и 0,9 мкг/мл) и 5 мкг/мл связанного с планшетом анти-GITR антитела Hum231#2 или изотипического контрольного антитела IgG1. Образцы инкубировали в течение 4 дней при 37°C и 5% CO₂. После инкубации клетки окрашивали активным в отношении аминов красителем ФИТЦ (Life technologies), чтобы окрасить мертвые клетки. После промывки охлажденным буфером FACS (1×PBS + 2% ФБС, pH 7,2) добавляли анти-OX40 антитело и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Клетки промывали, добавляли античеловеческий Fc F(ab')₂ Alexa647 и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. После этапа центрифугирования и промывки коктейль из антител, содержащий антитела против CD3 (APC Cy7, SP34.2), CD4 (PercP Cy5.5, L200), CD8a (PE Cy7, SK1) и PD-1 (PE, EH12.2H7), разведенные в охлажденном буфере FACS, добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Образцы промывали и пересуспендировали в 200 мкл 1,6% параформальдегида перед исследованием на проточном цитометре FACSCanto (BD Biosciences). Данные FACS анализировали при помощи программного обеспечения FloJo. Данные и графики по проточной цитометрии являются репрезентативными по экспериментам с МКГЖ от одного донора.

Как показано на фиг. 21, костимуляция анти-GITR антителом Hum231#2 повышает поверхностную экспрессию OX40 и PD-1 на человеческих Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺.

6.4. Пример 4: модифицирование гуманизированного варианта на уровне зародышевой линии

В этом примере описано получение гуманизированных вариантов зародышевой линии.

6.4.1. Дизайн библиотеки

Для получения гуманизированных вариантов с повышенным содержанием человеческой зародышевой линии путем внесения сайт-направленных мутаций посредством вырожденных кодонов в переменные области тяжелой и легкой цепи использовали подход с применением библиотеки. Вариательную область VH-цепи мутировали путем замещения 17 аминокислотных позиций с 2-4 аминокислотами, что привело к конечной вариативности 1,3E+06. Вариательную область легкой цепи мутировали в 9 аминокислотных позициях (2-3 аминокислоты на позицию), что привело к конечной вариативности 7,7E+02. Разные позиции каркасной области и CDR, включенные в библиотеку, приведены на фиг. 22. Библиотеки создавали, используя IGHV1-2*02 VH человеческой зародышевой линии (фиг. 22A) и IGKV4-1*01 VL человеческой зародышевой линии (фиг. 22B).

6.4.2. Создание библиотеки

Мутированные гуманизированные переменные области клонировали в ретровирусные экспрессионные векторы (pCMA). Далее эти конструкции применяли для трансдукции клеток preB и экспрессии антител на поверхности, используя технологию Retrocyte Display®. Ретровирусный экспрессионный вектор содержал 5' и 3' ДКП на основе MSCV, константную область иммуноглобулина (IGHG1 или IGKC), содержащую часть мембранного якоря (IGHG1), и ген поверхностного маркера CD4. Поверхностный

маркер и иммуноглобулин сопряжены посредством IRES (участок внутренней посадки рибосомы). Термин "вариабельная область" в этом примере означает перестроенные гены VDJ в случае тяжелой цепи и перестроенные гены VJ в случае легких цепей.

6.4.2.1. Создание библиотеки гуманизированной тяжелой цепи

Синтезированные гуманизированные вариабельные области тяжелой цепи (Eurofins MWG GmbH) клонировали в ретровирусный экспрессионный вектор, содержащий константную область иммуноглобулина (IGHG1), содержащую часть мембранного якоря. Расщепление и лигирование проводили на одном этапе и в одной пробирке при помощи рестрикционного фермента типа IIS LguI и лигазы T4-ДНК при 37°C в течение 1 ч. Синтезированный библиотечный материал гуманизированной тяжелой цепи (128,7 нг) лигировали в рамке в ретровирусный экспрессионный вектор pCMA (1 мкг) с соотношением вектор-вставка 1:3. Затем реакцию лигирования осаждали и концентрировали (8,3-кратно) до конечной концентрации ДНК 94 нг/мкл. Всю (3×4 мкл) концентрированную реакцию лигирования электропорировали в 80 мкл клеток DH10B (электрокомпетентные клетки E.coli ElectroMax DH10B, Invitrogen, Кат. № 12033-015) (1900 В/5 мс). Добавляли 1000 мкл среды SOC (Invitrogen, Кат. № 15544-034) и восстанавливали трансформированные клетки DH10B при 37°C в течение 1 ч. Проводили разведение 1:1000, чтобы определить сложность библиотеки. Полные реакции трансформации высевали в планшеты с LB-агаром +100 мкг/мл ампициллина и инкубировали в течение ночи при 37°C. Определенная сложность библиотеки гуманизированной VH-цепи составила 7,3E+07 и, следовательно, была восстановлена вариабельность всей библиотеки.

Все электропорированные бактерии счищали с планшетов и готовили 2 глицериновых маточных раствора для длительного хранения при -80°C. Проводили крупномасштабное получение ДНК-плазмид (Macherey & Nagel, NucleoBond Xtra Maxi Plus Kit). Расщепление для подтверждения наличия и правильного размера клонированной вставки из библиотечного материала гуманизированной VH-цепи проводили при помощи HindIII/Eco47III (H/E). Чтобы подтвердить правильность векторного остова применяли расщепление KpnI/BsrGI (K/B). В качестве контроля библиотечную плазмидную ДНК гуманизированной VH-цепи также расщепляли LguI, чтобы подтвердить количество вектора без вставок гуманизированных VH-цепей, а целостность вектора исследовали методом сепарации неразрезанной плазмидной ДНК.

Было получено 96 отдельных клонов и отправлено на секвенирование для определения конечной библиотечной вариабельности 89-AL (последовательность: 5' gcctccgcctcctcttccctcatcc 3'; SEQ ID NO: 707). При контроле качества не было обнаружено избыточных последовательностей. Теоретическая вариабельность составляет 1,3E+06 разных вариантов, следовательно, каждая уникальная последовательность перекрывается около 50 раз. 35% библиотечных клонов имели необходимое сочетание мутаций (=2,5E+07), а в библиотеке присутствовали все необходимые варианты.

6.4.2.2. Создание библиотеки гуманизированной легкой цепи

Синтезированные гуманизированные вариабельные области легкой цепи (Eurofins MWG GmbH) клонировали в ретровирусный экспрессионный вектор, содержащий константную область иммуноглобулина (IGKC). Расщепление и лигирование проводили, как описано в разделе 6.4.2.1. Синтезированный библиотечный материал гуманизированной легкой цепи (227,9 нг) лигировали в рамке в ретровирусный экспрессионный вектор pCMA (0,5 мкг) с соотношением вектор-вставка 1:10. Затем реакцию лигирования осаждали и 3,6-кратно концентрировали до конечной концентрации ДНК 52 нг/мкл.

Трансформация проводили, как описано в разделе 6.4.2.1, выше. 2×4 мкл концентрированной реакции лигирования электропорировали в 80 мкл клеток DH10B (электрокомпетентные клетки E.coli ElectroMax DH10B, Invitrogen, Кат. № 12033-015) (1900 В/5 мс). Определенная сложность библиотеки гуманизированной VL-цепи составила 4,6E+07 и, следовательно, была восстановлена вариабельность всей библиотеки. Получение библиотечной плазмидной ДНК и подтверждение плазмидной ДНК проводили, как описано в разделе 6.4.2.1. При контроле качества была обнаружена только одна избыточная последовательность. Теоретическая вариабельность составляет 7,7E+02 разных вариантов, следовательно, каждая уникальная последовательность перекрывается около 60000 раз. 65% библиотечных клонов имели необходимое сочетание мутаций, а в библиотеке присутствовали все необходимые варианты.

6.4.3. Восстановление модифицированных на уровне зародышевой линии тяжелых и легких цепей из предварительно отобранных клонов preB-клеток

Гуманизированный библиотечный материал, полученный, как описано выше (разделы 6.4.2.1 и 6.4.2.2), использовали в исследовании созревания аффинности Retrocyte Display®, чтобы выявить антигена с высоким содержанием генов зародышевой линии и улучшенными биологическими и биохимическими свойствами. Из двух 96-луночных планшетов, содержащих 80 и 96 предварительно отобранных клонов preB-клеток, восстанавливали тяжелые и легкие цепи. Клетки лизировали (набор для прямой ПЦР человеческих образцов Phusion, Thermo Scientific/Finnzymes, Кат. № F-150), а вариабельные области амплифицировали непосредственно при помощи ПЦР (см. табл. 15). ПЦР проводили со специфическим 5' прямым и 3' обратным праймером (см. табл. 16). В качестве матрицы для ПЦР использовали 2 мкл preB-клеточного лизата. Амплифицированные вариабельные области очищали (NucleoFast 96 PCR (Macherey - Nagel)) и клонировали в экспрессионные векторы CHO (pPEP), содержащие константную область имму-

ноглобулина (IGHG1, IGKC).

Таблица 15

Программы ПЦР			
1. Начальная денатурация	98°C	5 мин	34 цикла
2. Денатурация	98°C	1 с	
3. Отжиг/Элонгация	72°C	15 с	
11. Конечная элонгация	72°C	1 мин	
12. Охлаждение	10°C	Стабилизация	
Общее число циклов			35

Таблица 16

Праймеры для амплификации вариабельных областей тяжелой и легкой каппа цепи

Прямые ПЦР-праймеры (5')		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
5' hum231-32-15 Vh LguI (1192-Je)	5' tctgctcttaccatggaggactggcgcatctctgttc 3'	708
5' hum231-32-15 Vk LguI (1193-Je)	5' ctgctcttctatggtgttacagactcaggtgttc 3'	709
Обратные ПЦР-праймеры (3')		
3' H LguI Cg (1060-Je)	5' tacgctcttcaagctgctggaggcagcg 3'	710
3' K LguI Ck (1065-Je)	5' ctgctcttctgctcagcgtcaggggtgtc 3'	711

Чтобы клонировать предварительно отобранные модифицированные на уровне зародышевой линии вариабельные области тяжелой и легкой цепи, расщепление и лигирование проводили на одном этапе и в одной пробирке при помощи рестрикционного фермента типа IIS LguI и лигазы T4-ДНК при 37°C в течение 1 ч с конечным этапом при 80°C в течение 10 мин, а предварительно отобранные модифицированные на уровне зародышевой линии вариабельные области тяжелой и легкой цепи (~60 нг) лигировали в рамке в экспрессионные векторы pREP (50 мкг). Использовали соотношение вектор-вставка 1:12.

2 мкл реакций лигирования предварительно отобранной модифицированной на уровне зародышевой линии тяжелой цепи и 6 мкл реакций лигирования предварительно отобранной модифицированной на уровне зародышевой линии легкой цепи каппа котрансформировали в химически компетентные клетки DH10B (30 мкл) методом трансформации с применением теплового шока. Добавляли 1000 мкл среды SOC (Invitrogen, Кат. № 15544-034), а трансформированные клетки DH10B восстанавливали при 37°C в течение 1 ч. В конце добавляли 1000 мкл среды LB + ампициллин (конечная концентрация: 100 мкг/мл) и инкубировали трансформированные клетки E. coli в течение ночи при 37°C. Проводили получение ДНК-плазмид в небольшом масштабе (Macherey & Nagel, NucleoSpin 96 Plasmid), а расщепление для подтверждения наличия и правильного размера клонированных вариабельных областей проводили при помощи HindIII/NotI (VH-цепи) и NcoI (VK-цепи). Целостность вектора исследовали методом сепарации неразрезанной плазмидной ДНК. После этого препараты ДНК-плазмид использовали для трансфекции клеток CHO, а экспрессируемые антитела исследовали при помощи суспензионной матричной технологии и кинетического анализа Octet. Последовательности антител подтверждали ПЦР.

6.4.4. Отбор вариантов зародышевой линии

Было отобрано несколько сотен модифицированных на уровне зародышевой линии антител на основании кинетики связывания, определенной при помощи Octet (система Octet RED 96; ForteBio™ Inc., Menlo Park, CA). Экспериментальный процесс был поставлен в соответствии с инструкцией к инструменту. Биотин-GITR связывали со стрептавидиновым биосенсором (SA), а в качестве пустого контроля использовали PBS (pH 7,4). Вкратце, анализ взаимодействия проводили при 30°C в подвижном буфере (PBS, 0,05% Твин, pH 7,4). Сенсорные наконечники предварительно смачивали в подвижном буфере в течение 10 мин непосредственно перед применением, а микропланшеты, применяемые в Octet, наполняли 200 мкл на лунку образца или буфера и перемешивали при 800 об/мин. В экспериментах использовали коммерчески доступные предварительно покрытые наконечники SA. Биотинилированный GITR загружали в волокна ForteBio SA в PBS, pH 7,4, на 10 мин и промывали в течение 4 мин. Для фазы ассоциации перед измерениями покрытые лигандом наконечники SA погружали на 5 мин в клеточный культуральный супернатант, который был разведен 1:10 в подвижном буфере. Диссоциации комплекса антитело-антиген исследовали в лунках, содержащих только буфер Octet, в течение 5 мин. После каждого эксперимента наконечники восстанавливали глицином (10 mM, pH 2,0). Аффинность, $K_{асс}$ и $K_{дисс}$ определяли при помощи программного обеспечения Octet v6.3, применяя 1:1 модель связывания с полной локальной аппроксимацией. В табл. 17 перечислены составы вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи 56 отобранных модифицированных на уровне зародышевой линии вариантов и

величины их аффинности, $K_{\text{асс}}$ и $K_{\text{дисс}}$ согласно данным Octet.

Таблица 17

Кинетический анализ модифицированных на уровне зародышевой линии вариантов

ID антитела	Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:)	Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:)	Аффинность (M)	$K_{\text{асс}}$ (1/Mc)	$K_{\text{дисс}}$ (1/c)
1	H1916A01 (215)	K1916A01 (400)	7,44E-10	4,68E+05	3,48E-04
2	H1916A03 (217)	K1916A03 (401)	4,23E-09	5,53E+05	2,34E-03
4	H1916A05 (219)	K1916A05 (403)	1,43E-09	3,51E+05	5,01E-04
5	H1916A06 (220)	K1916A06 (404)	1,63E-09	5,91E+05	9,66E-04
6	H1916A07 (221)	K1916A07 (405)	2,70E-09	2,14E+05	5,79E-04
9	H1916A10 (224)	K1916A10 (408)	2,68E-09	2,93E+05	7,84E-04
10	H1916A11 (225)	K1916A11 (409)	9,11E-10	6,15E+05	5,60E-04
11	H1916A12 (226)	K1916A12 (410)	2,10E-09	4,03E+05	8,47E-04
15	H1916B05 (230)	K1916B05 (415)	2,22E-09	2,78E+05	6,16E-04
16	H1916B06 (231)	K1916B06 (416)	1,47E-09	3,56E+05	5,23E-04
18	H1916B09 (233)	K1916B09 (419)	3,77E-09	2,19E+05	8,24E-04
20	H1916B12 (236)	K1916B12 (421)	1,35E-09	2,83E+05	3,80E-04
21	H1916C03 (237)	K1916C03 (423)	8,44E-09	3,09E+05	2,61E-03
25	H1916C07 (241)	K1916C07 (427)	1,69E-09	3,74E+05	6,32E-04
29	H1916C11 (245)	K1916C11 (431)	1,06E-09	2,95E+05	3,13E-04
31	H1916D01 (247)	K1916D01 (433)	4,18E-10	5,05E+05	2,11E-04
33	H1916D03 (249)	K1916D03 (435)	9,01E-11	1,12E+07	1,01E-03
34	H1916D04 (250)	K1916D04 (436)	4,58E-10	5,57E+05	2,55E-04
35	H1916D05 (251)	K1916D05 (437)	1,87E-10	1,29E+06	2,40E-04
36	H1916D06 (252)	K1916D06 (438)	4,40E-10	6,38E+05	2,80E-04
37	H1916D07 (253)	K1916D07 (439)	3,17E-11	7,64E+06	2,42E-04
38	H1916D08 (254)	K1916D08 (440)	8,75E-11	8,57E+06	7,50E-04
39	H1916D09 (255)	K1916D09 (441)	2,55E-10	3,91E+06	9,97E-04
42	H1916E01 (259)	K1916E01 (444)	3,77E-10	4,17E+05	1,57E-04
43	H1916E03 (261)	K1916E03 (445)	1,28E-09	3,73E+05	4,77E-04
45	H1916E05 (263)	K1916E05 (447)	5,62E-10	4,55E+05	2,55E-04
46	H1916E06 (264)	K1916E06 (448)	6,19E-10	4,00E+05	2,48E-04
47	H1916E08 (265)	K1916E08 (450)	2,06E-09	3,91E+05	8,04E-04
49	H1916E11 (268)	K1916E11 (452)	2,09E-09	3,38E+05	7,07E-04
50	H1916F03 (270)	K1916F03 (454)	1,01E-09	2,52E+05	2,54E-04

52	H1916F05 (272)	K1916F05 (456)	1,07E-09	3,97E+05	4,26E-04
54	H1916F09 (276)	K1916F09 (458)	1,26E-09	5,48E+05	6,88E-04
55	H1916F10 (277)	K1916F10 (459)	1,27E-09	4,35E+05	5,50E-04
58	H1916G04 (283)	K1916G04 (462)	1,58E-09	2,63E+05	4,15E-04
59	H1916G05 (284)	K1916G05 (463)	1,04E-09	2,99E+05	3,12E-04
61	H1917A02 (287)	K1917A02 (467)	1,83E-09	7,72E+05	1,41E-03
68	H1917B01 (298)	K1917B01 (474)	1,55E-09	2,89E+05	4,47E-04
70	H1917B04 (301)	K1917B04 (476)	2,01E-09	4,37E+05	8,79E-04
71	H1917B07 (304)	K1917B07 (477)	2,41E-10	1,05E+06	2,52E-04
75	H1917C09 (313)	K1917C09 (484)	2,92E-09	3,17E+05	9,25E-04
76	H1917C10 (314)	K1917C10 (485)	2,72E-09	3,86E+05	1,05E-03
78	H1917D01 (316)	K1917D01 (488)	1,00E-09	3,25E+05	3,27E-04
79	H1917D04 (319)	K1917D04 (489)	2,87E-09	4,50E+05	1,29E-03
80	H1917D07 (320)	K1917D07 (490)	6,96E-10	6,52E+05	4,54E-04
85	H1917E02 (327)	K1917E02 (495)	1,28E-09	2,89E+05	3,70E-04
86	H1917E03 (328)	K1917E03 (496)	7,50E-10	5,77E+05	4,32E-04
91	H1917F03 (340)	K1917F03 (501)	3,07E-09	5,20E+05	1,59E-03
92	H1917F05 (342)	K1917F05 (502)	1,01E-09	3,57E+05	3,61E-04
94	H1917G01 (350)	K1917G01 (504)	1,18E-09	3,72E+05	4,40E-04
95	H1917G05 (354)	K1917G05 (505)	2,21E-09	3,05E+05	6,72E-04
96	H1917G06 (355)	K1917G06 (506)	1,09E-09	3,44E+05	3,73E-04
97	H1917G07 (356)	K1917G07 (507)	1,43E-09	5,34E+05	7,61E-04
101	H1917H01 (362)	K1917H01 (511)	3,54E-10	9,36E+05	3,32E-04
102	H1917H02 (363)	K1917H02 (512)	1,97E-09	3,21E+05	6,32E-04
105	H1917H07 (366)	K1917H07 (516)	1,38E-09	3,51E+05	4,86E-04
107	H1917H09 (368)	K1917H09 (518)	2,21E-09	2,98E+05	6,57E-04

Из этих антител было отобрано некоторое количество для последующего анализа на основании дополнительных величин Octet и гомологии зародышевой линии. Те антитела, которые проявили агонистические свойства в анализе Т-клеток (данные не показаны) исследовали более подробно, как описано ниже. Фиг. 23 подробно иллюстрирует состав вариабельных областей тяжелой и легкой цепи этих модифицированных на уровне зародышевой линии вариантов. Фиг. 24А, 24В и 24С подробно иллюстрируют состав областей тяжелой и легкой цепи других отобранных фактических или прогнозируемых модифицированных на уровне зародышевой линии вариантов.

6.4.5. Кинетический анализ модифицированных на уровне зародышевой линии вариантов

Количественную оценку и анализ связывания вариантов анти-GITR антител зародышевой линии проводили, используя суспензионную матричную технологию, как описано в разделе 6.2.5.1. Средняя относительная аффинность вариантов зародышевой линии по сравнению с химерным родительским антителом 231-32-15 приведена на фиг. 23.

Кроме того, используя суспензионную матричную технологию, проводили оценку блокирования лиганда в соответствии с методом, описанным в примере 6.2.5.2.

Как видно на фиг. 25А и 25В, связывание GITRL-PE с GITR в присутствии выборки вариантных антител зародышевой линии имеет очень сходный профиль для исследуемых антител.

Эти вариантные антитела зародышевой линии дополнительно исследовали в функциональном анализе, как описано ниже в примере 5.

6.5. Пример 5: функциональная активность вариантов зародышевой линии

6.5.1. Влияние вариантов зародышевой линии на стимулируемую анти-CD3 пролиферацию Т-клеток CD4+ и выработку цитокинов

Чтобы оценить активность новых вариантов зародышевой линии, как описано в примере 4, эти варианты сравнивали с гуманизированными антителами Hum231#1 и Hum231#2 и химерным родительским антителом 231-32-15 на обогащенных Т-клетках CD4 из четырех препаратов лейкоцитарных пленок BC4, BC9, BC13 и BC18. Анализ субоптимальной стимуляции CD3 проводили, как описано в разделе 6.3.1, выше, а внутриклеточное окрашивание цитокинов (BC13 и BC18), высвобождение цитокинов (BC4 и BC9) и разбавление CFSE (BC4 и BC9) определяли через 5 дней после проведения анализа стимуляции. Связанное с планшетом анти-CD3 и растворимое анти-CD28 антитела использовали со связанными с планшетом анти-GITR антителами, без антител (только CD3) и изотипическим контролем (антитело MSC8). Анти-GITR антитела применяли в концентрации 10 мкг/мл. В случае лейкоцитарных пленок 4 и 9 анти-CD3 антитело применяли в концентрации 125 нг/мл, анти-CD28 антитело - в концентрации 125 нг/мл и 10 Е ИЛ-2. В случае лейкоцитарной пленки 13 анти-CD3 антитело применяли в концентрации 500 нг/мл, а анти-CD28 антитело - в концентрации 100 нг/мл. В случае лейкоцитарной пленки 18 анти-

CD3 антитело применяли в концентрации 31,25 нг/мл, а анти-CD28 антитело - в концентрации 100 нг/мл.

В случае препаратов лейкоцитарных пленок BC4 и BC9 супернатанты и клетки собирали с планшета после 5 дней в культуре. Была определена пролиферация клеток и показана в виде процентного содержания CFSE низк. (фиг. 26А и 26В), а супернатанты использовали для анализа цитокинов (ИФН γ и ИЛ-10). Фиг. 27А и 27В иллюстрируют высвобождение цитокинов для BC4, а фиг. 28А и 28В иллюстрируют высвобождение цитокинов для BC9.

В случае препаратов лейкоцитарных пленок BC13 и BC18 после 5 дней в культуре во все образцы добавляли монензин (eBioscience) в течение 6 ч, чтобы сделать возможным внутриклеточное удержание ИФН γ . Затем образцы внутриклеточно окрашивали в отношении ИФН γ -РЕ (eBioscience) при помощи набора BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) с последующим выявлением методом проточной цитометрии на BD FACS Aria I (BD Biosciences) и анализировали при помощи программного обеспечения FlowJo (Tree Star). Результаты влияния вариантов зародышевой линии на процентное содержание ИФН γ положительных Т-клеток CD4 из BC13 и BC18 показаны на фиг. 29А и 29В соответственно. После контакта с вариантами зародышевой линии, химерным родительским антителом 231-32-15 или гуманизированными вариантами Hum231#1 и Hum231#2 процентное содержание ИФН γ положительных Т-клеток CD4, индуцированное этими анти-GITR антителами, было сопоставимым. При этом, как и ожидалось, между донорами существует небольшая вариация.

6.5.2. Влияние вариантов зародышевой линии на репортерную линию клеток GITR NF- κ B-люцифераза

В этом примере исследовали варианты зародышевой линии, полученные, как описано в примере 4, используя репортерную линию клеток GITR NF- κ B-люцифераза (Promega), описанную в разделе 6.3.8.

Репортерную линию клеток (Promega) поддерживали в культуре в соответствии с инструкцией производителя. В день эксперимента клетки пересуспендировали в аналитической среде (RPMI + 1% ФБС). Клетки (100000 клеток на лунку) добавляли в 96-луночный планшет, который содержал связанное с планшетом анти-CD3 антитело (клон SP34, 0,3 мкг/мл) и различные концентрации (12,5, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 и 0 мкг/мл) связанных с планшетом анти-GITR антител. Репортерные клетки инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO $_2$. После инкубации определяли экспрессию люциферазы при помощи Bio-Glo (Promega) и мультиметочного ридера EnVision 2100.

Исследуемыми в этом анализе анти-GITR антителами были Hum231#2w и 20 вариантов зародышевой линии: pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, pab2159, pab2160 и pab2161. Как показано на фиг. 30А-С, все варианты зародышевой линии демонстрировали агонистическую активность в репортерном анализе GITR NF- κ B-люцифераза.

Варианты зародышевой линии также исследовали в отношении агонистической активности в отсутствие анти-CD3 антитела. В день эксперимента репортерные клетки GITR NF- κ B-люцифераза (Promega) пересуспендировали в аналитической среде (RPMI + 1% ФБС). Клетки (100000 клеток на лунку) добавляли в 96-луночный планшет, который содержал различные концентрации (12,5, 10, 5, 2,5, 1,25 и 0,625 мкг/мл) связанных с планшетом анти-GITR антител. Репортерные клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 5% CO $_2$. После инкубации определяли экспрессию люциферазы при помощи Bio-Glo (Promega) и мультиметочного ридера EnVision 2100.

Исследуемыми в этом анализе анти-GITR антителами были m6C8, Hum231#2w и 20 вариантов зародышевой линии: pab1964, pab1965, pab1966, pab1967, pab1968, pab1969, pab1970, pab1971, pab1972, pab1973, pab1975, pab1976, pab1977, pab1979, pab1980, pab1981, pab1983, pab2159, pab2160 и pab2161. Все варианты зародышевой линии индуцировали дозозависимую активацию репортерной клеточной линии в отсутствие анти-CD3 антитела (фиг. 30D-F).

6.6. Пример 6: Эпитопная характеристика анти-GITR антител

Чтобы получить характеристики эпитопа на человеческом GITR, который распознает химерное родительское антитело 231-32-15 и гуманизированные анти-GITR антитела, проводили дополнительные исследования, описанные ниже.

6.6.1. Эпитопная конкуренция - анализ клеточного связывания

Чтобы подтвердить, что гуманизированные варианты антитела сохраняют эпитопную специфичность родительского химерного антитела 231-32-15, проводили анализ клеточного связывания. Собирали пре-В-клетки 1624-5, экспрессирующие химерное родительское антитело 231-32-15 и пересуспендировали 1×10^6 клеток в 200 мкл буфера FACS плюс: i) биотинилированный GITR (GITR-bio) (1:1000), который предварительно инкубировали в течение 15 мин с 2 мкг химерного родительского антитела 231-32-15; ii) GITR-bio (1:1000), который предварительно инкубировали в течение 15 мин с 2 мкг Hum231#1; iii) GITR-bio (1:1000), и Hum231#2; или iv) GITR-bio (1:1000). Клетки инкубировали в течение 20 мин при 4°C, а затем промывали 4 мл буфера FACS и центрифугировали в течение 5 мин при 300g при 4°C. Клеточный осадок пересуспендировали в 200 мкл буфера FACS плюс стрептавидин-РЕ (1:1000), а затем инкубировали и промывали, как и ранее. Затем клетки пересуспендировали в 200 мкл буфера FACS для анализа при помощи FACS-AriaII (BD Biosciences).

Фиг. 31 иллюстрирует, что гуманизированные вариантные антитела сохраняли эпитопную специфичность химерного родительского антитела 231-32-15. С правой стороны показано связывание GITR-bio с пре-B-клетками 1624-5, экспрессирующими химерное родительское антитело 231-32-15. Однако когда GITR-bio предварительно инкубировали с химерным родительским антителом 231-32-15, антителами Hum231#1 или Hum231#2, наблюдали снижение связывания GITR-bio с клетками 1624-5 (с левой стороны). Перекрывающиеся профили FACS свидетельствуют о том, что гуманизированные варианты также демонстрируют сходные друг с другом и химерным родительским антителом 231-32-15 GITR-связывающие свойства.

6.6.2. Эпитопная конкуренция - суспензионная матричная технология

Анти-GITR антитела (25 мкл) разводили до 2 мкг/мл в аналитическом буфере (Roche 11112589001) и инкубировали с гранулами 1500 Luminex® (5 мкл, Luminex Corp, без 5 LC10005-01), сопряженными с античеловеческим IgG (F(ab)₂-специфический, JIR, 105-006-097), в течение ночи в 0,5 мл пробирках Lo-Bind (Eppendorf, 0030108.116) в условиях встряхивания в темноте. Затем эту смесь переносили в предварительно смоченные 96-луночные фильтровальные планшеты (Millipore, MABVN1250). Планшеты дважды промывали 200 мкл/лунку PBS, чтобы удалить несвязанное антитело. В то же время инкубировали 20 мкг/мл тех же анти-GITR антител, других анти-GITR антител или аналитического буфера с 20 мкл (1 мкг/мл) R-PE меченого антигена GITR (R&D systems, дисульфидно-связанный гомодимер; 689-GR; внутрилабораторно меченый AbDSerotec LYNX Kit, LNK022RPE) в течение 1 ч в темноте при 650 об/мин. Смесь гранул и смесь антиген/антитело смешивали 1:1 (20 мкл каждой) и инкубировали в течение дополнительного часа в условиях встряхивания (20°C, 650 об/мин). Непосредственно перед измерением в каждую лунку добавляли 40 мкл аналитического буфера, а анализ проводили при помощи системы Luminex® 200 (Millipore) и получали данные по 100 гранулам в 48 мкл объема образца. Связывание определяли, используя величины СИФ для неконкурирующего контроля (100% связывания, только аналитический буфер в качестве конкурирующего соединения).

Когда в качестве захватывающего антитела применяли химерное родительское антитело 231-32-15, наблюдали полную конкуренцию за связывание с обоими гуманизированными вариантами. Когда в качестве захватывающего антитела применяли анти-GITR антитело m6C8, конкуренцию за связывание с химерным родительским антителом 231-32-15 или двумя гуманизированными вариантами не наблюдали (данные не показаны). Эти результаты свидетельствуют, что m6C8 и описанные в данном документе анти-GITR антитела распознают разные эпитопы на человеческом GITR.

6.6.3. Эпитопная конкуренция - поверхностный плазменный резонанс

Для эпитоп-специфической сортировки с применением поверхностного плазмонного резонанса использовали "тандемный подход" (Abdiche YN et al. (2009) Analytical Biochemistry, 386: 172-180). С этой целью на сенсорном чипе CM5 генерировали разные поверхности (GE Healthcare, Series S CM5, BR-1005-30) при помощи иммобилизации разных плотностей антигена GITR (R&D systems, дисульфидно-связанный гомодимер; 689-GR). Проточная кювета 2 содержала антиген GITR с низкой плотностью (667 EO), средняя плотность была зарегистрирована в проточной кювете 3 (1595 EO), а в проточной кювете 4 была достигнута высокая плотность (4371 EO). В проточной кювете 1 (1289 EO, Pierce ThermoFisher 77120) для сравнения был иммобилизован овальбумин. Иммобилизацию проводили в соответствии со стандартным протоколом от производителя (GE Healthcare) для аминного сопряжения (активация поверхности 0,4 М ЭДК и 0,1 М NHS, набор для аминного сопряжения GE Healthcare, BR-1000-50). Непрореагировавшие группы инактивировали 1 М этанол-амин-HCl, pH 8,5. После этого анти-GITR антитела проводили через разные поверхности в концентрации 300 нМ (45 мкг/мл) в течение 240 при 5 мкл/мин. При этих условиях должно достигаться насыщение поверхности GITR. Перед добавлением конкурентного антитела (300 нМ, 5 мкл/мин) было включено время диссоциации в 60 с. Восстановление поверхности чипа проводили при помощи 10 мМ глицина, pH 2,0 (GE Healthcare, BR-1003-55) в течение 60 с при 10 мкл/мин. Сортировку проводили, используя единицы ответа (EO) неконкурентного контроля (100% связывания, условия насыщения).

Как показано на фиг. 32, если химерное родительское антитело 231-32-15 сначала связывают с GITR, дополнительного связывания этого антитела не наблюдается. При этом если химерное родительское антитело 231-32-15 сначала связывают с GITR и применяется антитело m6C8, это антитело способно связываться с GITR.

6.6.4. Эпитопное картирование анти-GITR антител

Чтобы картировать эпитоп на GITR, с которым связываются описанные в данном документе анти-GITR антитела, применяли ПЦР с внесением ошибок для получения вариантов человеческого антигена GITR. Вариантные белки GITR экспрессировали на поверхности клеток из клеточной библиотеки и проводили скрининг этих клеток в отношении связывания анти-GITR антитела. В качестве положительного контроля использовали поликлональное анти-GITR антитело, чтобы подтвердить правильный фолдинг белка GITR. В случае вариантов человеческого антигена GITR, с которыми наблюдалось сниженное или отсутствующее связывание, проводили аланин-сканирующий мутагенез, чтобы определить точные эпитопные остатки, которые были необходимы для связывания описанными в данном документе анти-GITR

антителами.

6.6.4.1. Получение человеческих вариантов G1TR

Для получения вариантов человеческого G1TR со случайными мутациями во внеклеточном домене применяли ПЦР-мутагенез с внесением ошибок. Для проведения ПЦР с внесением ошибок использовали набор для случайного мутагенеза GeneMorphII (Stratagene) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, проводили 20 ПЦР-циклов в объеме 50 мкл, применяя в качестве матрицы внутрилабораторную конструкцию (13 нг, номер конструкции 4377 рМА-Т-huG1TR), 0,05 Е/мкл ДНК-полимеразы Mutazyme II, 1× реакционного буфера Mutazyme II, 0,2 мМ каждого праймера (1152-Je (последовательность 5' gagtcctctgaggccaccatg 3'; SEQ ID NO: 712) и 1204-Je (последовательность 5' cgcggccgcgaattctta 3'; SEQ ID NO: 713)) и 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ). Образцы амплифицировали при помощи ПЦР (Eppendorf, Germany) согласно следующей программе: 95°C в течение 2 мин; 20 циклов по 95°C в течение 30 с, 56°C в течение 30 с, 72°C в течение 1 мин; и конечный этап удлинения при 72°C в течение 10 мин. Гель-очистку продукта ПЦР проводили, используя 1% агарозный гель, вырезали полосу ДНК, соответствующую ожидаемому размеру 720 п.о., а гель-экстракцию проводили при помощи NucleoSpin Gel и набора для ПЦР-очистки от Macherey&Nagel в соответствии с руководством. Очищенную ДНК лигировали во внутрилабораторный экспрессионный вектор посредством сайтов XhoI/EcoRI, используя ДНК-лигазу T4 и соотношение 1:3 (вектор:вставка). Лигирование (25°C) прекращали через 2 ч этапом тепловой денатурации в течение 10 мин при 65°C. Проводили EtOH-осаждение ДНК из реакции лигирования, используя дрожжевую tРНК. Применяли стандартные методы расщепления и лигирования. Реакцию лигирования электропорировали в клетки DH10B (электрокомпетентные клетки E.coli ElectroMax DH10B, Invitrogen; 1900 В/5 мс). Электропорированные бактерии высевали на планшеты с LB-агаром +100 мкг/мл ампициллина и получали колонии из приблизительно $1,9 \times 10^8$ клеток.

Затем все электропорированные бактерии счищали с планшетов и использовали для крупномасштабного получения ДНК-плазмид (Macherey&Nagel, NucleoBond Xtra Maxi Plus Kit) в соответствии с инструкциями производителя для получения библиотеки ДНК. Для контроля качества библиотеки проводили расщепление рестрикционными ферментами XhoI/EcoRI и BsrGI/EcoRI. Отдельные клоны были отобраны и отправлены на секвенирование для определения конечной библиотечной вариативности с применением праймера 1155-Je (прям; последовательность 5' ccttgaaacctcctcgctg 3'; SEQ ID NO: 714).

6.6.4.2. Создание клеточной библиотеки с вариантами человеческого G1TR

Для экспрессии мутантов человеческого G1TR на поверхности клеток 1624-5 применяли стандартные методы трансфекции с последующей трансдукцией. Для получения ретровирусных частиц библиотеку ДНК и векторы, экспрессирующие ретровирусные белки Gag, Pol и Env, трансфицировали в ретровирусную пакующую линию клеток (клеток НЕК), используя ДНК-трансфекционный реагент XtremeGENE 9 (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Полученные в результате ретровирусные частицы накапливались в культуральном супернатанте ретровирусных пакующих клеток. Через два дня после трансфекции собирали не содержащие клеток, но содержащие вирусные векторные частицы супернатанты и проводили спин-инфицирование клеток 1624-5. Получали эффективность трансдукции (% клеток, экспрессирующих человеческий G1TR) около 4%. После непрерывного культивирования в течение по меньшей мере одного дополнительного дня проводили отбор клеток, используя пуромидин (1,5 мкг/мл). Нетрансдуцированные клетки служили в качестве отрицательного контроля (ОК). После отбора антибиотиком большинство клеток стабильно экспрессировали человеческий антиген G1TR на клеточной поверхности. Нежизнеспособные клетки удаляли на этапе Фиколл-сепарации.

Метод FACS использовали для отбора клеток, экспрессирующих правильно свернутых мутантов человеческого G1TR с применением поликлонального анти-G1TR, и для последующего отбора отдельных клеток, экспрессирующих варианты человеческого G1TR, которые не связываются с анти-G1TR химерным родительским антителом 231-32-15. Вкратце, связывающие антитело клетки анализировали методом FACS, а клетки, которые проявляли специфическое связывание антитела отделяли от популяции несвязывающих клеток методом препаративного высокоскоростного FACS (FACSARIAII, BD Biosciences). Пулы реактивных и неактивных в отношении антител клеток снова экспандировали в тканевой культуре и, благодаря стабильному фенотипу экспрессии трансдуцированных ретровирусом клеток, циклы направленного на антитело клеточного сортирования и экспансии тканевой культуры повторяли до момента получения четко выявляемой популяции неактивных в отношении анти-G1TR антитела (химерного родительского 231-32-15) клеток. Эту популяцию неактивных в отношении анти-G1TR антитела (химерного родительского 231-32-15) клеток подвергали конечному сортированию одиночных клеток. После нескольких дней экспансии клеток прошедшие сортирование клетки снова исследовали в отношении отсутствия связывания с анти-G1TR химерным родительским антителом 231-32-15 и связывания с поликлональным анти-G1TR антителом, применяя анализ в 96-луночных планшетах на инструменте FACSCalibur (BD Biosciences).

6.6.4.3. Анализ эпитопов

Чтобы связать фенотип (поликлональное анти-GITR⁺, химерное родительское 231-32-15-) с генотипом, проводили секвенирование прошедших сортировку вариантов huGITR. На фиг. 33 проиллюстрировано выравнивание последовательностей этих вариантов. Аминокислотные остатки на фиг. 33 пронумерованы в соответствии с незрелой аминокислотной последовательностью человеческого GITR (SEQ ID NO: 701). Секвенирование позволило определить области с повышенным количеством мутаций или "горячих точек" (например, P62 и G63), обеспечив определение эпитопа на человеческом GITR, распознаваемого анти-GITR химерным родительским антителом 231-32-15. Чтобы подтвердить точные аминокислотные остатки человеческого GITR, вовлеченные в связывание с анти-GITR антителами, проводили замещение аланином аминокислот в горячих точках. Следующие позиции (пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 701) по отдельности мутировали на аланин: P28A, T29A, G30A, G31A, P32A, T54A, T55A, R56A, C57A, C58A, R59A, D60A, Y61A, P62A, G63A, E64A, E65A, C66A, C67A, S68A, E69A, W70A, D71A, C72A, M73A, C74A, V75A и Q76A. Для экспрессии этих аланиновых мутантов человеческого GITR на поверхности клеток 1624-5 применяли стандартные методы трансфекции с последующей трансдукцией.

И наконец, аланиновые мутанты, экспрессируемые на клетках 1624-5, исследовали методом проточной цитометрии (FACSCalibur; BD Biosciences) в отношении связывания анти-GITR гуманизированного варианта Hum231#2, трех вариантов зародышевой линии (pab1967, pab1975 и pab1979) и стандартного антитела m6C8. Вкратце, клетки 1624-5, экспрессирующие отдельных аланиновых мутантов человеческого GITR, инкубировали с 2 мкг/мл моноклональных анти-GITR антител Hum231#2, трех вариантов зародышевой линии (pab1967, pab1975 и pab1979) или антитела m6C8; или поликлонального анти-GITR антитела (AF689, R&D systems), конъюгированного с APC, и блокиратором Fc-рецепторов (1:200; BD Кат. № 553142), разведенных в 100 мкл буфера FACS (PBS + 2% ФТС) в течение 20 мин при 4°C. После промывки, в случае необходимости для выявления, клетки инкубировали с вторичным анти-IgG антителом (APC-конъюгированное; BD Кат. № 109-136-097), разведенным в 100 мкл буфера FACS (PBS + 2% ФТС) в течение 20 мин при 4°C. Затем клетки промывали и анализировали при помощи проточного цитометра (BD Biosciences). Величину средней интенсивности флуоресценции (СИФ) исследуемого моноклонального антитела делили на величину СИФ поликлонального антитела, получая соотношение СИФ (моноклональное антитело/поликлональное антитело) для отдельных аланиновых мутантов GITR. Среднее соотношение СИФ ("соотношение ССИФ") рассчитывали на основании отдельных соотношений СИФ для всех мутантов. На фиг. 34А представлена таблица в обобщенными данными по связыванию Hum231#2, трех вариантов зародышевой линии (pab1967, pab1975 и pab1979) и стандартного антитела m6C8 с клетками 1624-5, экспрессирующими аланиновых мутантов человеческого GITR. Считалось, что отдельное соотношение СИФ, превышающее после нормирования 60% соотношения ССИФ, указывает на одинаковое связывание с поликлональным антителом и представлено на фиг. 34А знаком "+". Отдельное соотношение СИФ, составляющее от 30 до 60% соотношения ССИФ, представлено на фиг. 34А знаком "+/-". Отдельное соотношение СИФ, составляющее менее 30% соотношения ССИФ, представлено на фиг. 34А знаком "-".

Как показано на фиг. 34А, мутант D60A и мутант G63A, пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 701, специфическим образом нарушали или ослабляли связывание анти-GITR гуманизированного варианта Hum231#2 и трех вариантов зародышевой линии (pab1967, pab1975 и pab1979), но не стандартного антитела m6C8. Мутант C58A нарушал связывание всех пяти антител и, вероятно, представляет собой структурную мутацию, а не эпитоп-специфическую. Мутант C74A характеризовался слабой экспрессией и не мог быть использован для сравнения связывания. Кроме того, анти-GITR антитела 231-32-15, Hum231#2 и m6C8 сравнивали в отношении их связывания с GITR дикого типа и мутантным человеческим GITR. Вкратце, человеческий GITR дикого типа и два аланиновых мутанта GITR (мутант D60A и мутант G63A, пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 701) экспрессировали на поверхности клеток 1624-5, как описано выше, и исследовали методом проточной цитометрии, как описано выше, при этом клетки сначала окрашивали 2 мкг/мл моноклональных антител 231-32-15, Hum231#2 и m6C8 или поликлонального антитела, конъюгированного с APC, а затем, в случае необходимости для выявления, окрашивали, используя вторичное анти-IgG антитело (APC-конъюгированное; 1:1000; BD Кат. № 109-136-097). Все величины средней интенсивности флуоресценции (СИФ) рассчитывали как среднее по двум измерениям. Величину СИФ исследуемого моноклонального антитела для конкретного типа клеток делили на величину СИФ поликлонального антитела для того же типа клеток, получая всего девять соотношений СИФ (моноклональное антитело/поликлональное антитело): соотношение СИФ_{231-32-15, WT}, соотношение СИФ_{Hum231#2, WT}, соотношение СИФ_{m6C8, WT}, соотношение СИФ_{231-32-15, D60A}, соотношение СИФ_{Hum231#2, D60A}, соотношение СИФ_{m6C8, D60A}, соотношение СИФ_{231-32-15, G63A}, соотношение СИФ_{Hum231#2, G63A} и соотношение СИФ_{m6C8, G63A}. Процентную долю связывания антитела с аланиновыми мутантами GITR по сравнению с GITR дикого типа рассчитывали, деля конкретное соотношение СИФ для аланиновых мутантов GITR на соответствующее соотношение СИФ для дикого типа (например, деля соотношение СИФ_{Hum231#2, D60A} на соотношение СИФ_{Hum231#2, ДТ}). Процент снижения связывания определяли, рассчитывая, например, $100\% \times (1 - (\text{соотношение СИФ}_{\text{Hum231#2, D60A}} / \text{соотношение СИФ}_{\text{Hum231#2, ДТ}}))$. Как показано на фиг. 34В, мутант D60A и мутант G63A специфическим образом нарушали или ослабляли связывание 231-32-15 и Hum231#2, но не m6C8. Процентные доли на фиг. 34В представляют процентные доли

GITR-положительных клеток на каждом графике. При исследовании с клетками, экспрессирующими GITR D60A, связывание антитела было снижено на 82% и 88% для 231-32-15 и Hum231#2, соответственно, по сравнению с 10% снижением для m6C8. Аналогично, при исследовании с клетками, экспрессирующими GITR G63A, связывание 231-32-15 и Hum231#2 было снижено на 37% и 59%, соответственно, в то время как связывание m6C8 было повышено на 62%.

Для получения дополнительных характеристик связывания анти-GITR антител сравнивали связывание антител с GITR яванского макака. Незрелый белок GITR яванского макака содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 704. Чтобы повысить экспрессию белка первый остаток сигнального пептида GITR яванского макака замещали метионином, получая V1M GITR яванского макака. Затем получали мутантный GITR яванского макака V1M/Q62P/S63G, в котором аминокислотные остатки в позициях 62 и 63 (GlnSer), пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 704, были замещены соответствующими остатками человеческого GITR (ProGly). На фиг. 35A представлено выравнивание последовательностей между человеческим GITR, V1M GITR яванского макака и V1M/Q62P/S63G GITR яванского макака. Три белка, приведенные на фиг. 35A, экспрессировали на поверхности клеток 1624-5, как описано выше, и исследовали методом проточной цитометрии, как описано выше, при этом клетки сначала окрашивали 2 мкг/мл моноклональных антител 231-32-15, Hum231#2 и m6C8 или поликлонального антитела, конъюгированного с APC, а затем окрашивали, используя вторичное анти-IgG антитело (APC-конъюгированное; 1:1000; BD Кат. № 109-136-097).

Как показано на фиг. 35B, анти-GITR антитела 231-32-15 и Hum231#2 проявляли связывание только с клетками, экспрессирующими V1M/Q62P/S63G GITR яванского макака, но не клетками, экспрессирующими V1M GITR яванского макака.

6.7. Пример 7: обработка Т-клеток *in vitro* агонистическими анти-GITR антителами с последующей инфузией Т-клеток

Экспрессирующие GITR Т-клетки, что указывает на активированный статус, можно дополнительно активировать для уничтожения клеток-мишеней, таких как опухолевые клетки, если культивировать их с агонистическим антителом к GITR, например, Hum231#1, Hum231#2, Hum231#2w или другим описанным в данном документе агонистическим антителом к GITR, перед инфузией субъекту, например, субъекту-человеку с раком.

Уровень экспрессии GITR на Т-клетках, выделенных из организма субъекта, например, субъекта-человека, оценивают стандартными методами, например, методом FACS. Источником Т-клеток является, например, периферическая кровь, образец биопсии/хирургический образец лимфатического узла в месте опухоли или образец биопсии/хирургический образец самой опухоли, в которой может наблюдаться инфильтрация Т-клеток. Т-клетки выделяют, например, из МКИП, лимфатической ткани или опухолевой ткани стандартными методами. Если на поверхности Т-клеток наблюдается экспрессия GITR, клетки можно инкубировать с агонистическим антителом к GITR, например, Hum231#1, Hum231#2, Hum231#2w или другим описанным в данном документе агонистическим антителом к GITR, в концентрациях в диапазоне, например, от 1 мкг/мл до 1 мг/мл, в течение, например, 30 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48 или 72 ч, с последующей, например, внутривенной инфузией Т-клеток субъекту.

Если на Т-клетках, выделенных из организма субъекта, не наблюдается экспрессия GITR, ее можно индуцировать путем совместной инкубации Т-клеток и агентом, стимулирующим РТК-комплекс, такими как например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форболмиристацетат (ФМА), или антителом, стимулирующее РТК-комплекс, такое как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело (в концентрациях в диапазоне, например, от 1 мкг/мл до 1 мг/мл, в течение, например, 30 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48 или 72 ч). В альтернативном варианте может быть предпочтительно сначала инкубировать Т-клетки только с анти-CD3 антителом с последующим добавлением агонистического антитела к GITR через 30 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48 или 72 ч. Также может быть необходимо стимулировать Т-клетки опухолевым антигеном, например, в форме пептидов или белков, в присутствии антигенпрезентирующих клеток, чтобы активировать и увеличить число опухолеспецифических Т-клеток. После стимуляции антигеном Т-клетки можно культивировать с агонистическим антителом к GITR, чтобы повысить статус их активации перед инфузией.

Т-клетки можно инфузировать субъекту в течение, например, 30 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 6, 12 или 24 ч, и можно инфузировать субъекту один, два, три, четыре или более раз, например, с интервалами в 1, 2, 3 или 4 недели или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Число инфузируемых Т-клеток можно определить стандартными экспериментальными методами, и оно может составлять, например, 1×10^6 клеток, 1×10^7 клеток, 1×10^8 клеток, 1×10^9 клеток или более.

В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки можно приводить в контакт с агентом, таким как митоген (например, ФГА) или цитокин (например, ИЛ-2), чтобы неспецифическим образом расширить популяцию Т-клеток до, во время или после обработки агонистическим антителом к GITR.

В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки можно приводить в контакт с другим агонистом в дополнение к агонистическому антителу к GITR, например, агонистическим антителом к OX40.

Изобретение не ограничивается объемом описанных в данном документе конкретных вариантов реализации. В действительности на основании вышеизложенного описания и прилагающихся фигур специалистам в данной области техники станет очевидным существование различных модификаций изобретения помимо описанных.

Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагающейся формулы изобретения.

Все ссылки (например, публикации или патенты, или патентные заявки), перечисленные в данном документе, в полном объеме и во всех смыслах включены в данный документ посредством ссылки так, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация или патент, или патентная заявка) была специально и отдельно, в полном объеме и во всех смыслах включена посредством ссылки. Другие варианты реализации изобретения входят в объем нижеприведенной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим глюкокортикоид-индуцированным TNFR-подобным белком (GITR), содержащее:

(а) гипервариабельный участок (CDR) 1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 7), где

X_1 представляет собой D, E или G;

X_2 представляет собой A или V; и

X_3 представляет собой Y или H;

(b) VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$ (SEQ ID NO: 8), в которой

X_1 представляет собой V или L;

X_2 представляет собой R, K или Q;

X_3 представляет собой Y или F;

X_4 представляет собой D, E или G;

X_5 представляет собой V или L;

X_6 представляет собой T или S;

X_7 представляет собой K, R или Q; и

X_8 представляет собой D, E или G;

(c) VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(d) CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность $KSSQSLNSX_1NQKNYLX_2$ (SEQ ID NO: 10), в которой

X_1 представляет собой O или S; и

X_2 представляет собой T или S;

(e) VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и

(f) VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность QNX_1YSX_2PYT (SEQ ID NO: 12), в которой

X_1 представляет собой D или E; и

X_2 представляет собой Y, F или S.

2. Антитело по п.1, содержащее:

(а) VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и

VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(b) VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и

VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108;

(c) VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и

VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; или

(d) VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и

VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

3. Антитело по п.1 или 2, причем антитело содержит последовательность VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203, и/или антитело содержит последовательность VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205.

4. Антитело по п.1, где антитело содержит последовательность VH, обладающую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 206, и/или антитело содержит последовательность VL, обладающую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 208.

5. Антитело по п.4, где антитело содержит последовательность VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208.

6. Антитело по п.4 или 5, где антитело содержит VH, содержащую VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

7. Антитело по п.4, где антитело содержит последовательность VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206.

8. Антитело по п.4 или 7, где антитело содержит VL, содержащую
VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16,
VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и
VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

9. Антитело по п.1, содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208.

10. Антитело по п.1, содержащее:

(a) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 255, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 441;

(b) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 440; или

(c) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 440.

11. Антитело по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, представляющую собой человеческий иммуноглобулин IgG1.

12. Антитело по любому из пп.1-10, где антитело дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи представляет собой человеческий иммуноглобулин IgG4.

13. Антитело по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что антитело дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, представляющую собой человеческий иммуноглобулин IgG1, содержащий мутацию N297A.

14. Антитело по п.1, отличающееся тем, что содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 567; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 576.

15. Антитело по любому из пп.1-12 или 14, отличающееся тем, что индуцирует, активирует или повышает активность человеческого GITR, необязательно в клетке независимо от инициации РТК.

16. Антитело по любому из пп.1-12, 14 или 15, отличающееся тем, что:

(a) индуцирует, активирует или повышает активность NF-κB в клетке независимо от инициации РТК,

(b) повышает процентное содержание полифункциональных (ИФНγ+ ФНОα+) Т-клеток,

(c) при связывании с активированными регуляторными Т-клетками связывается с активирующими Fc-гамма-рецепторами, выбранными из группы, состоящей из CD16, CD32A и CD64, в большей степени, чем антитело при связывании с активированными эффекторными Т-клетками связывается с активирующими Fc-гамма-рецепторами, выбранными из группы, состоящей из CD16, CD32A и CD64, причем необязательно активирующий Fc-гамма-рецептор экспрессируется на клетке, выбранной из группы, состоящей из миелоидных эффекторных клеток и лимфоцитарных эффекторных клеток, и/или

(d) повышает поверхностную экспрессию OX40, PD-1 или их комбинации в активированных Т-клетках.

17. Антитело по любому из пп.1-16, отличающееся тем, что является гуманизированным антителом, мышинным антителом или химерным антителом.

18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VH антитела по любому из пп.1-17.

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VL антитела по любому из пп.1-17.

20. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-17.

21. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела по любому из пп.1-17.

22. Фармацевтическая композиция для индукции, активации или повышения активности GITR, содержащая антитело по любому из пп.1-17 или молекулы нуклеиновых кислот по пп.18 и 19 или 20 и 21 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

23. Применение антитела по любому из пп.1-17 для лечения рака, где рак поддается лечению путем индукции, активации или повышения активности GITR.

24. Применение антитела по любому из пп.1-17 в комбинации с другим терапевтическим агентом для лечения рака, где рак поддается лечению путем индукции, активации или повышения активности GITR.

25. Применение по п.24, где другой терапевтический агент представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), а антитело и ингибитор ИДО находятся в разных фармацевтических композициях и в виде отдельных лекарственных форм.

26. Применение по п.25, где ингибитор ИДО выбирают из эпакадостата, F001287, индоксимода и NLG919.

27. Применение по п.24, где другой терапевтический агент представляет собой агент, нацеленный на контрольные точки.

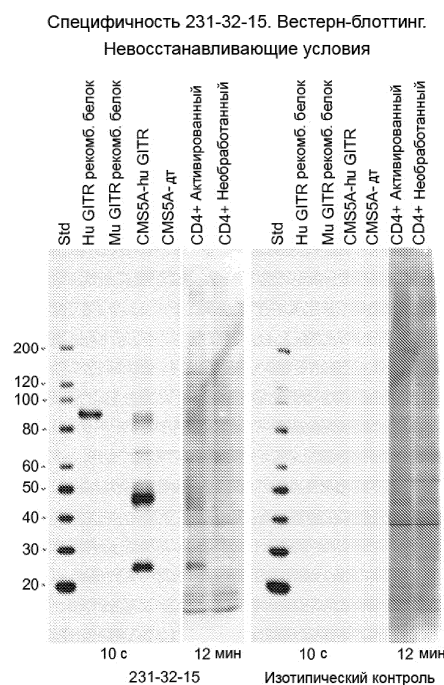
28. Применение по п.27, где нацеленный на контрольные точки агент выбирают из группы, состоящей из антагонистического анти-PD-1 антитела, антагонистического анти-PD-L1 антитела, антагонистического анти-PD-L2 антитела, антагонистического анти-CTLA-4 антитела, антагонистического анти-TIM-3 антитела, антагонистического анти-LAG-3 антитела и агонистического анти-OX40 антитела.

29. Применение по п.24, где другой терапевтический агент представляет собой вакцину.

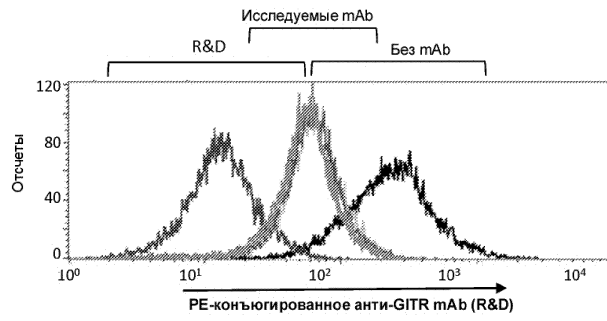
30. Применение по п.29, где вакцина содержит пептидный комплекс белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока, комплексированный с антигенным пептидом.

31. Применение по любому из пп.23-30, в котором рак представляет собой рак эндометрия, рак желудка, рак желудка, рак пищевода, карциному пищеводно-желудочного соединения, плоскоклеточную карциному головы и шеи, меланому, немелкоклеточный рак легкого или почечно-клеточную карциному.

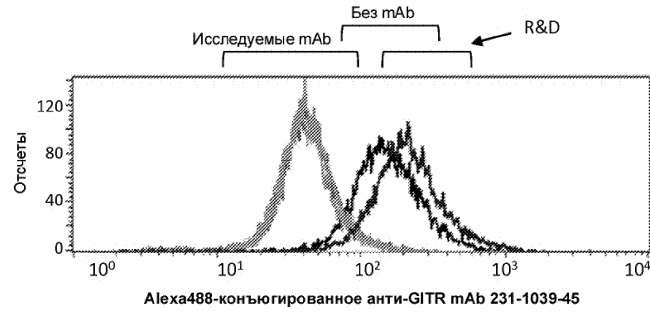
32. Применение антитела по любому из пп.1-17 для лечения вирусной инфекции, где вирусная инфекция поддается лечению путем индукции, активации или повышения активности GITR.



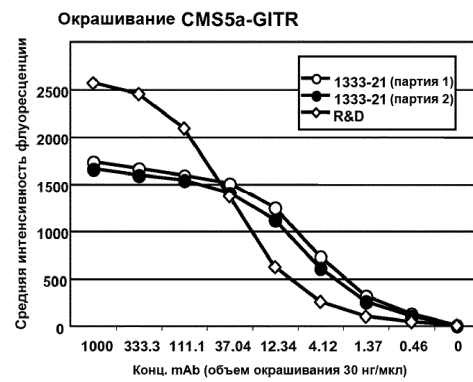
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В

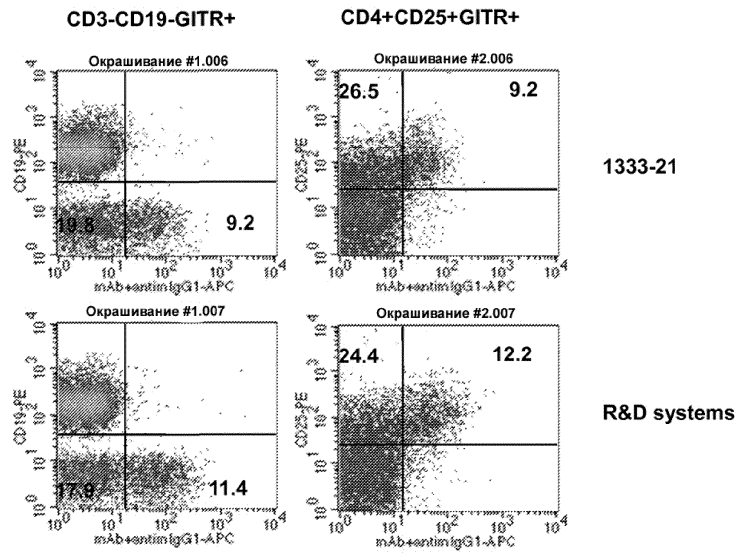


Фиг. 3А

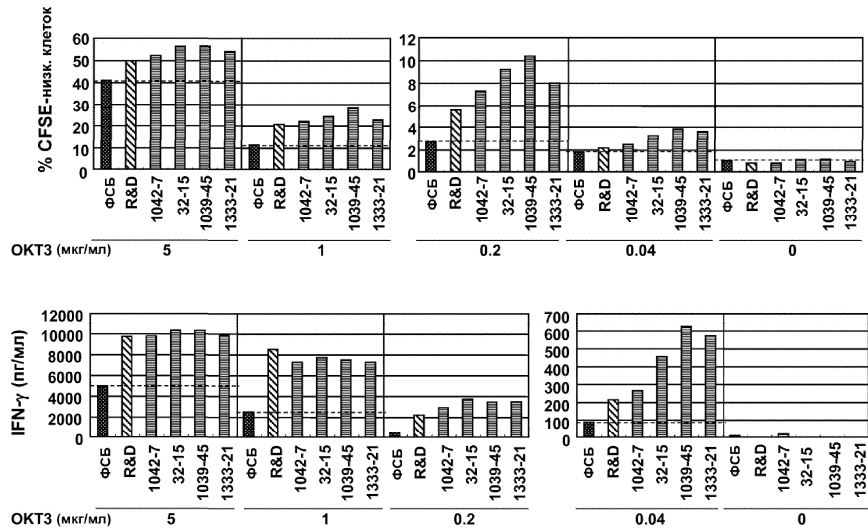


Фиг. 3В

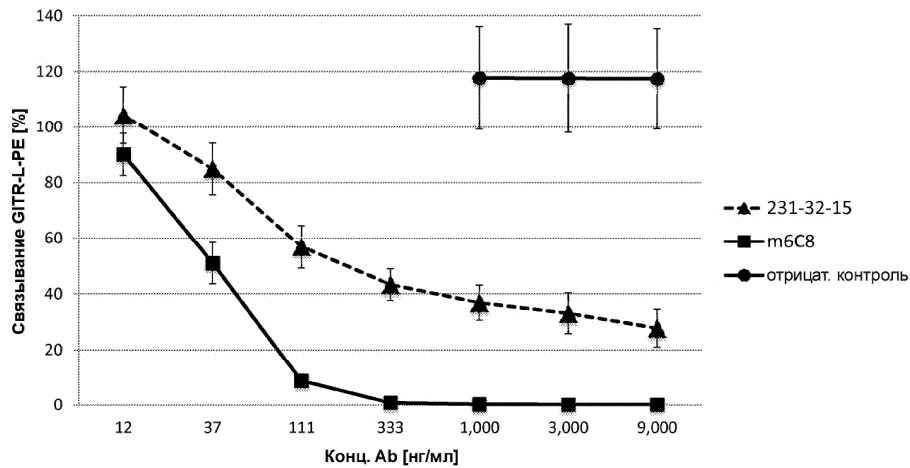
Окрашивание ex-vivo МКПК



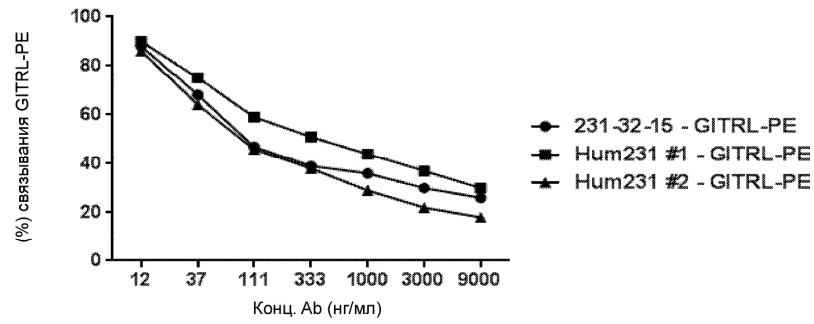
Фиг. 3С



Фиг. 4

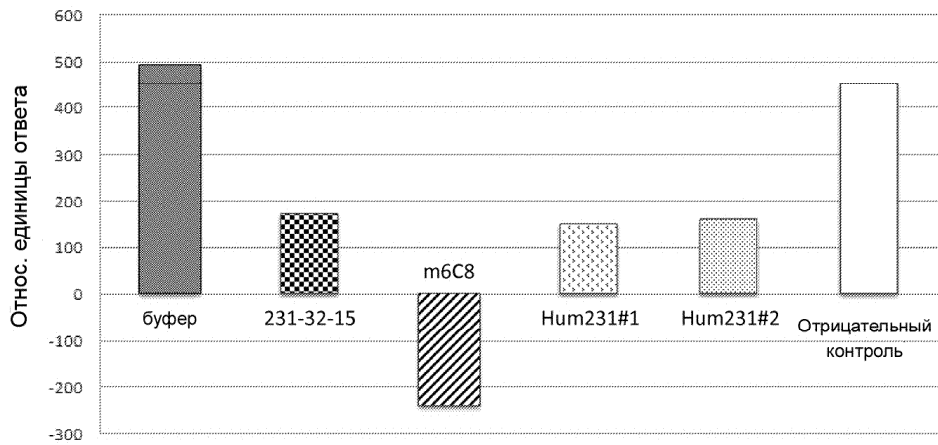


Фиг. 5

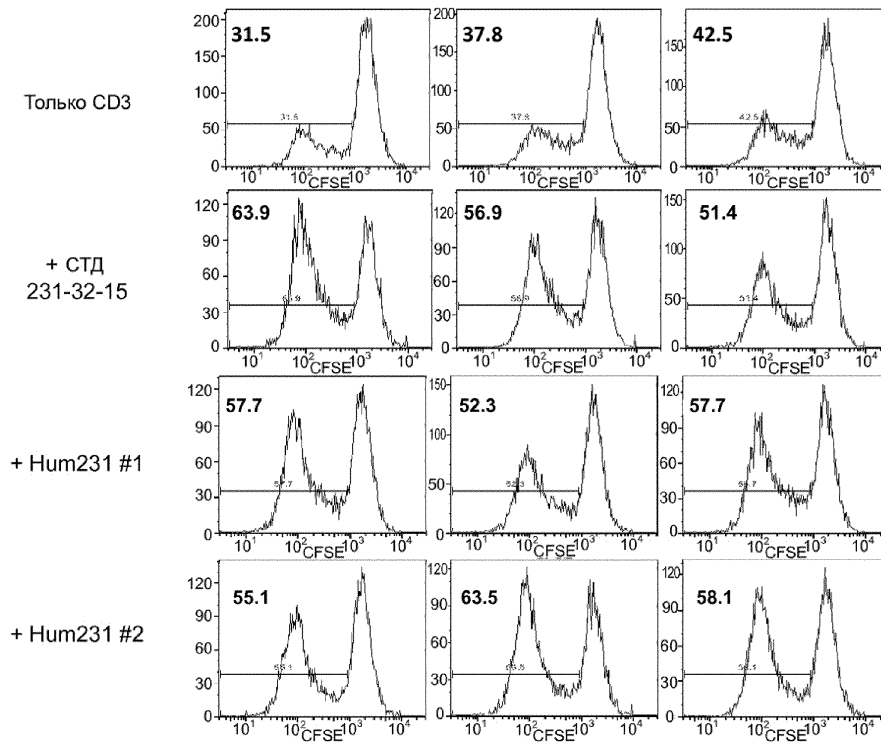


Фиг. 6

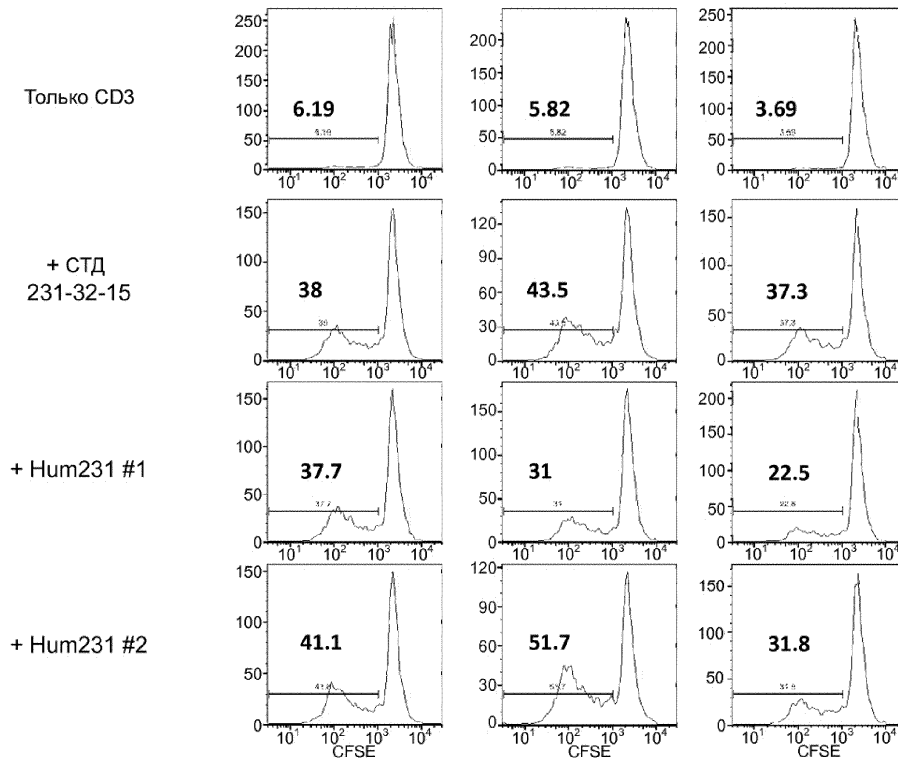
Связывание лиганда GITR в присутствии mAb



Фиг. 7

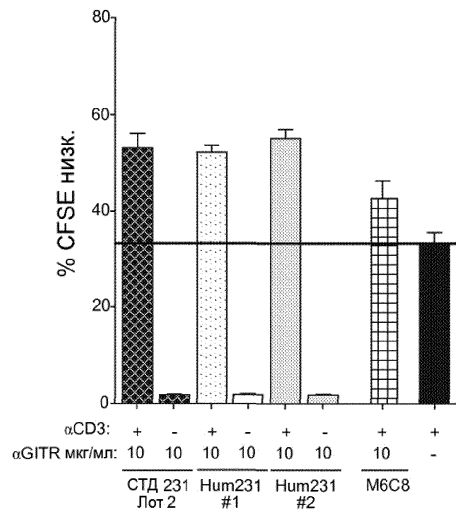


Фиг. 8А



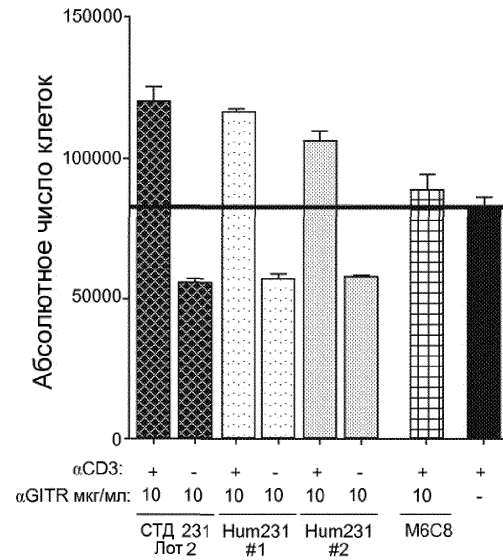
Фиг. 8В

Пролиферация обогащенных Т-клеток CD4 (125 нг/мл CD3)

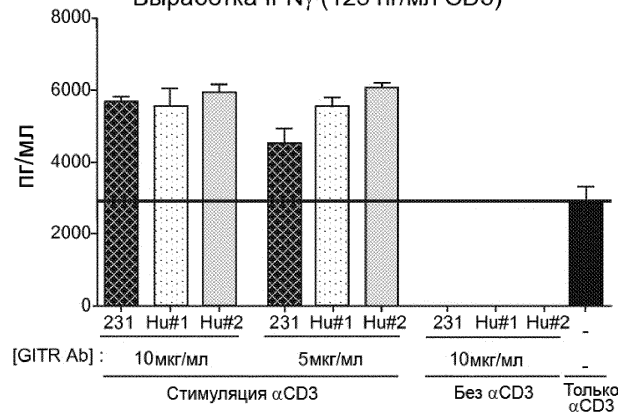


Фиг. 9А

Пролиферация обогащенных Т-клеток CD4 (125 нг/мл CD3)

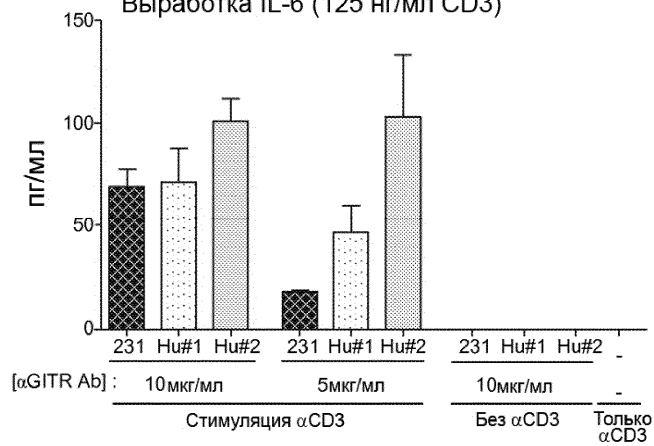


Фиг. 9В

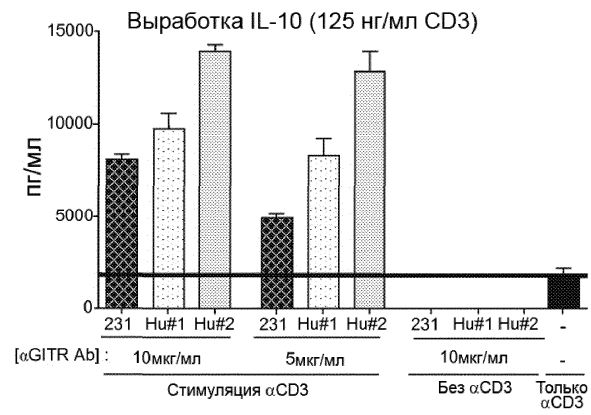
Выработка IFN γ (125 нг/мл CD3)

Фиг. 10А

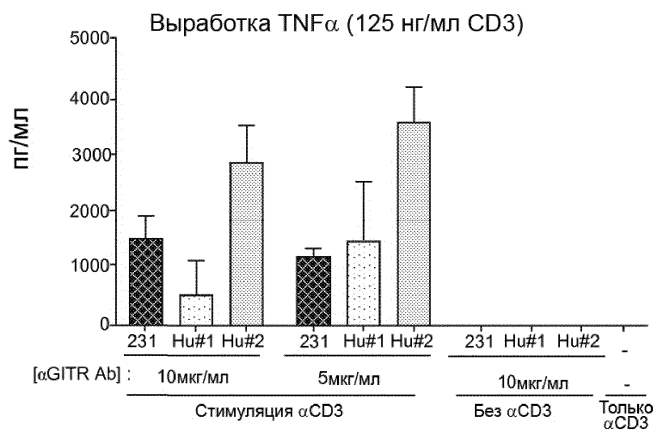
Выработка IL-6 (125 нг/мл CD3)



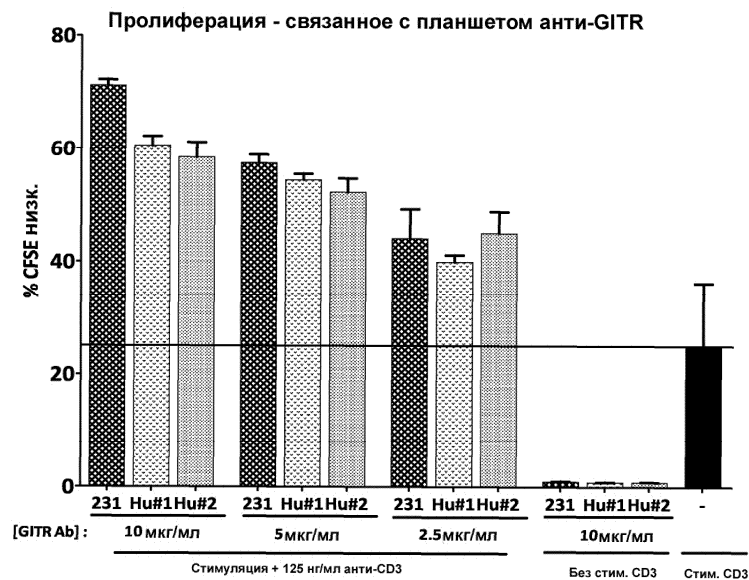
Фиг. 10В



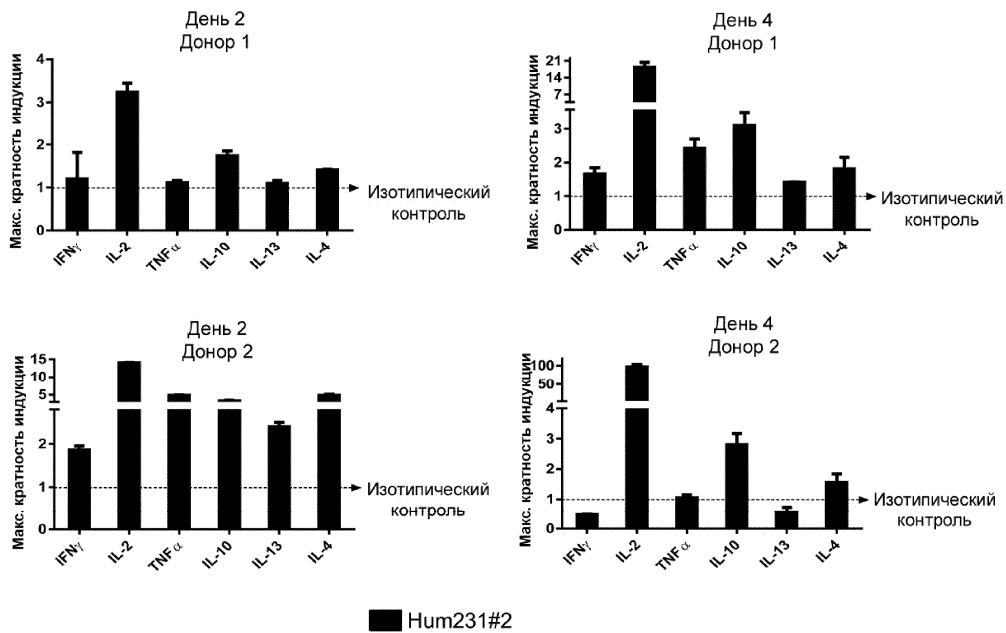
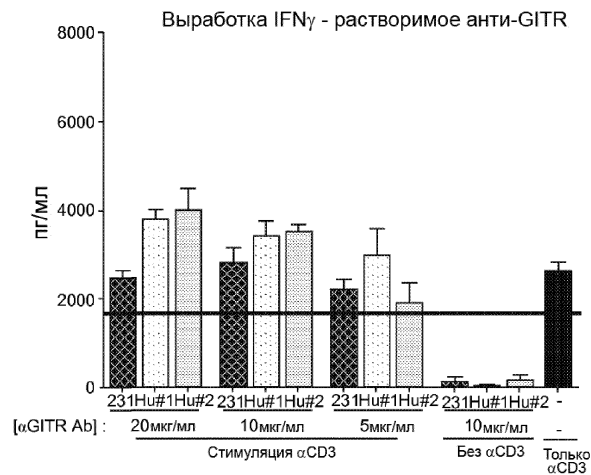
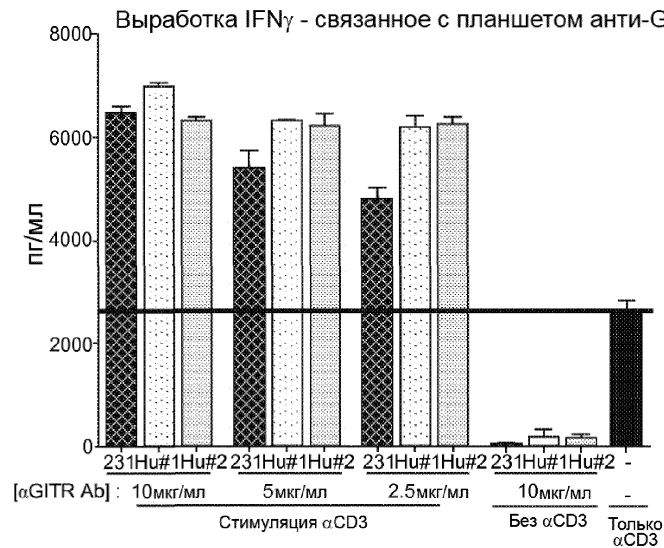
Фиг. 10С



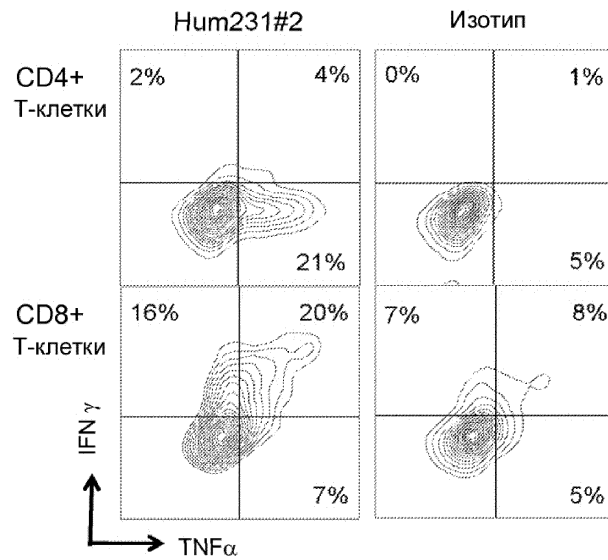
Фиг. 10D



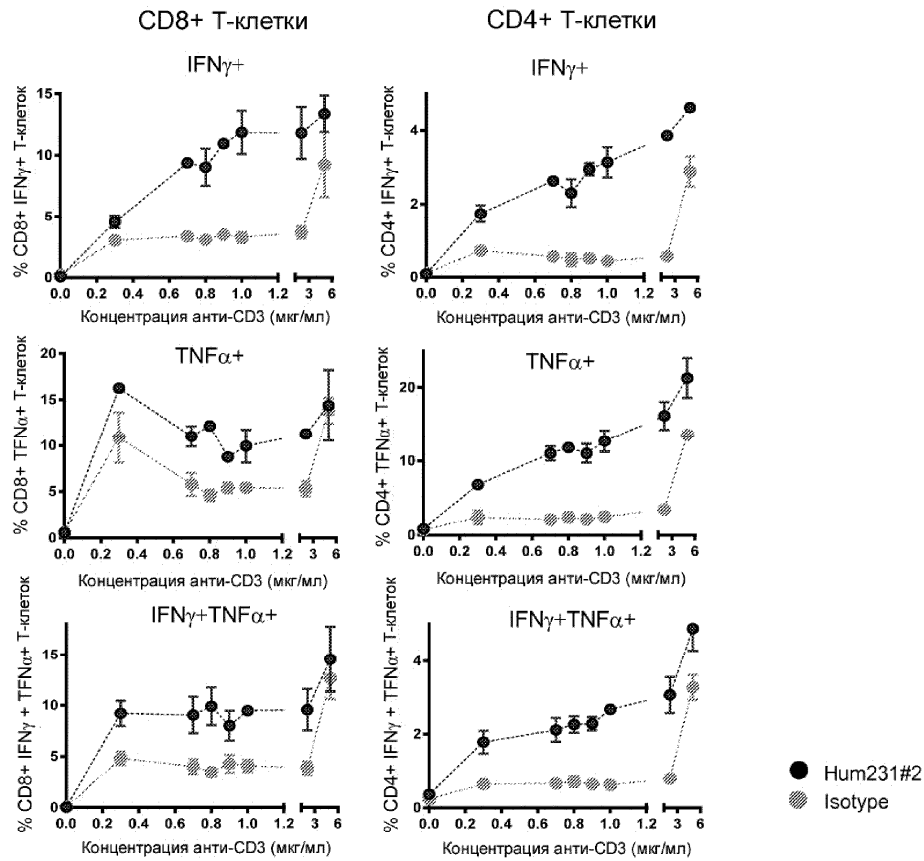
Фиг. 11



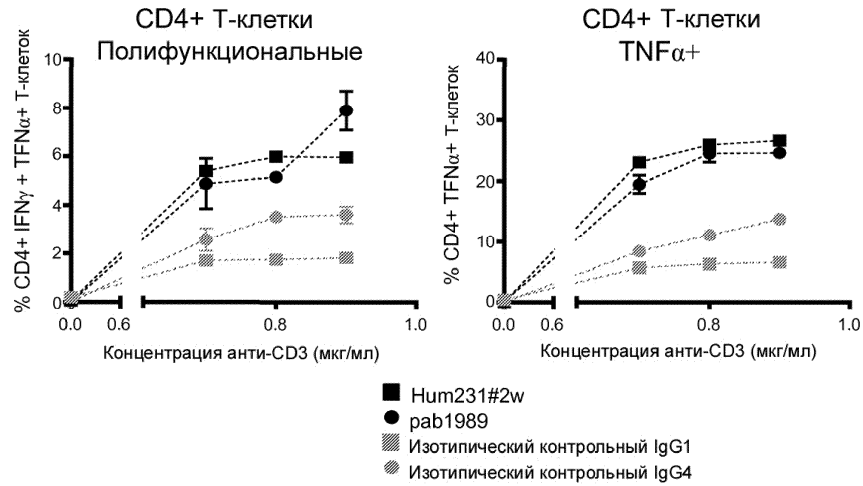
Фиг. 13



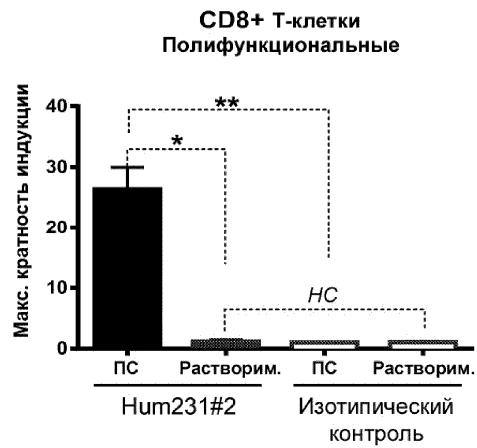
Фиг. 14А



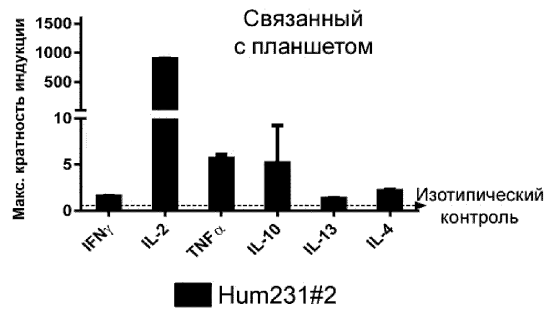
Фиг. 14В



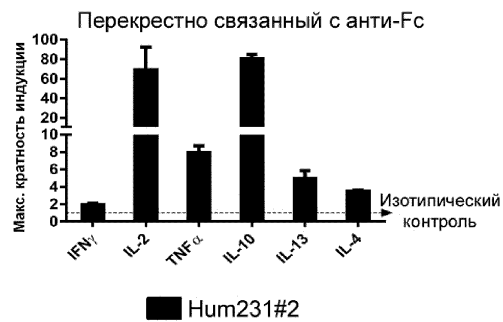
Фиг. 14С



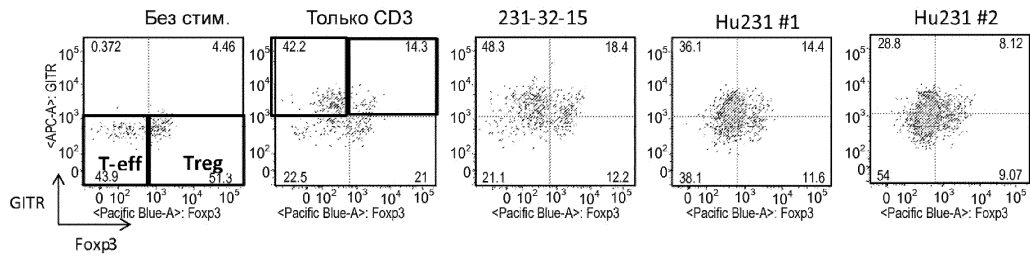
Фиг. 15А



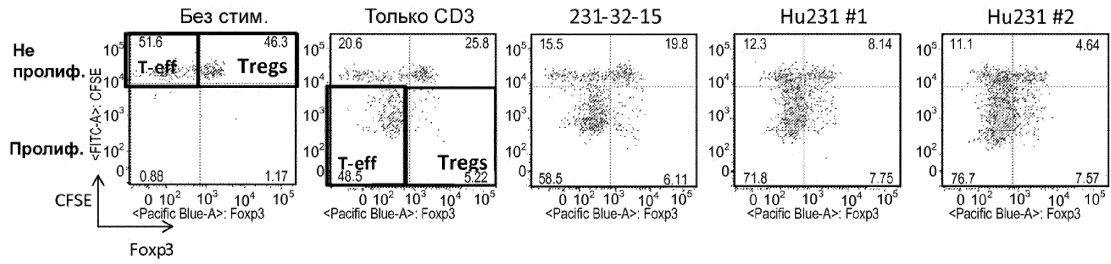
Фиг. 15В



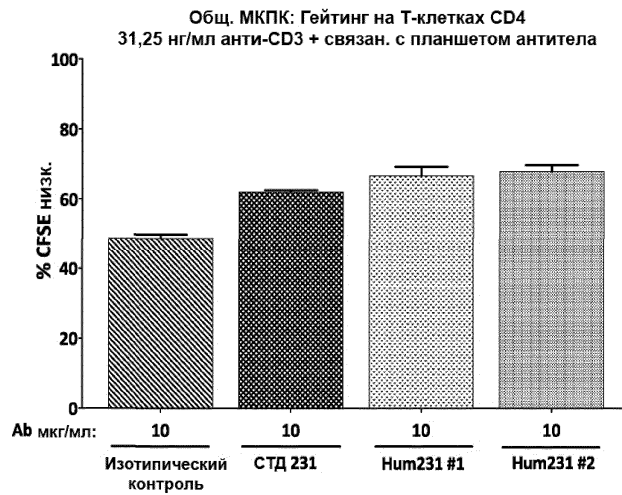
Фиг. 15С



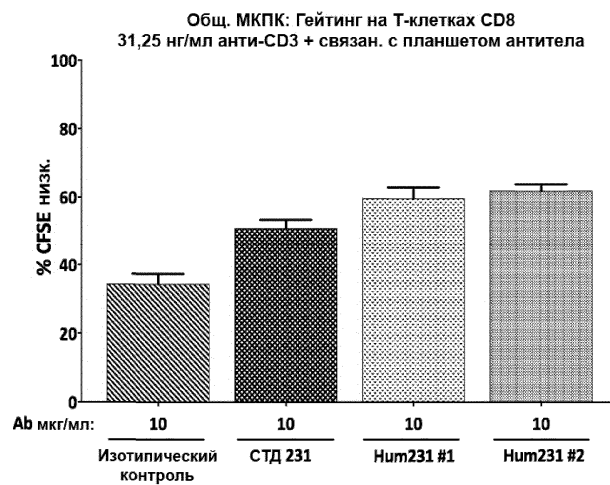
Фиг. 16А



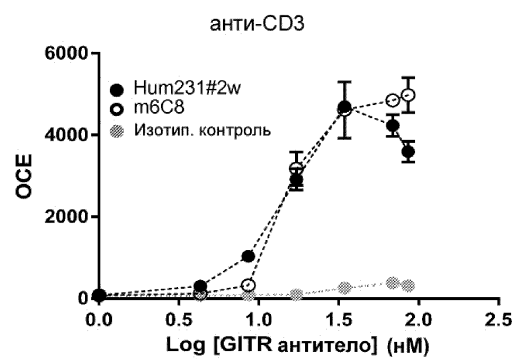
Фиг. 16В



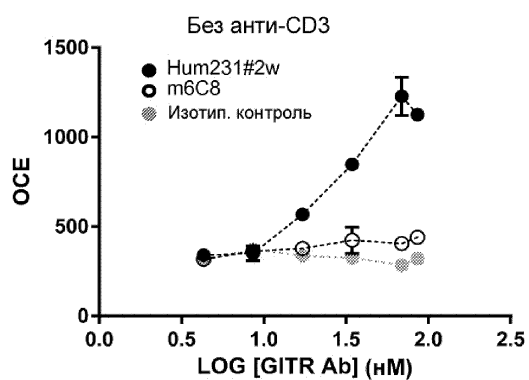
Фиг. 17А



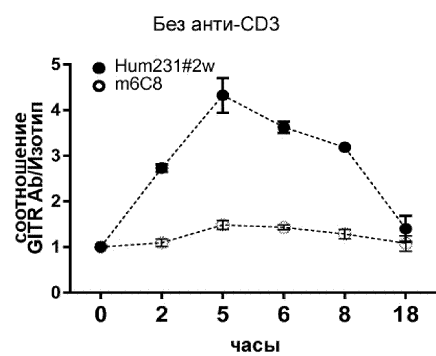
Фиг. 17В



Фиг. 18А

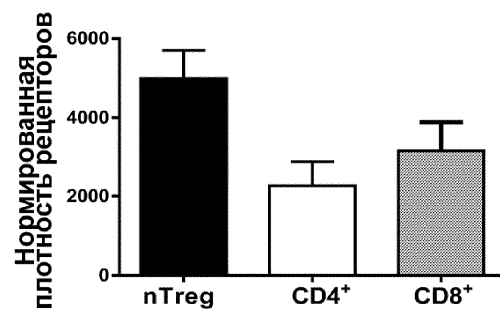


Фиг. 18В

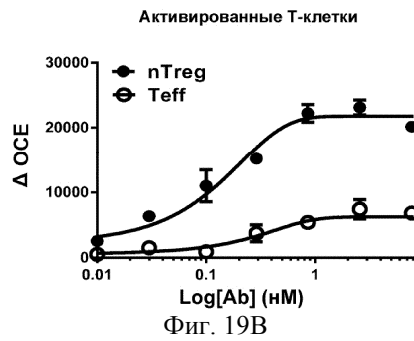


Фиг. 18С

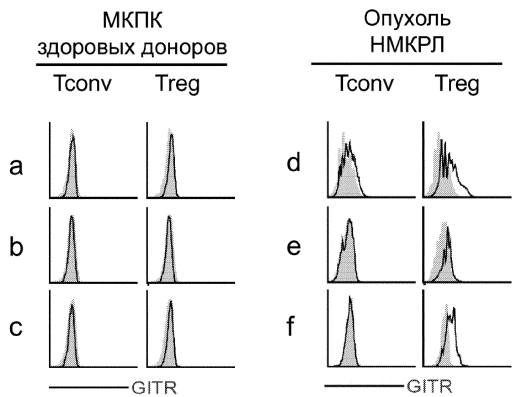
Активированные Т-клетки



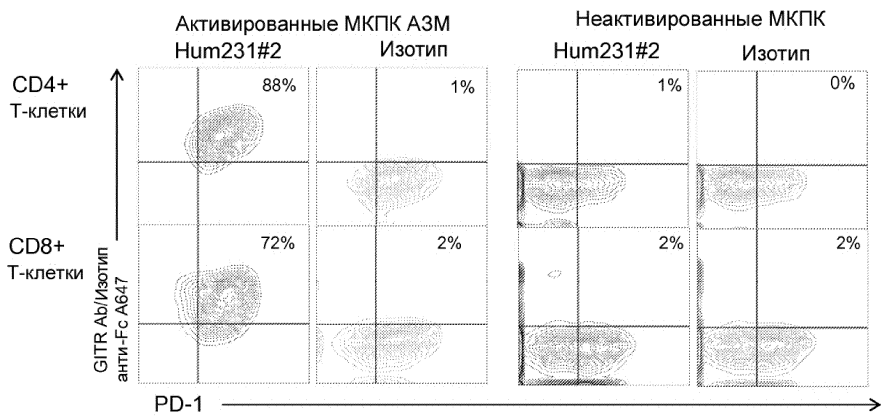
Фиг. 19А



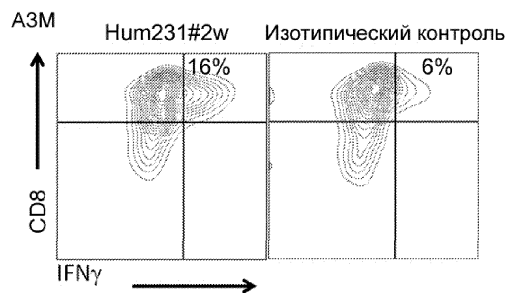
Фиг. 19В



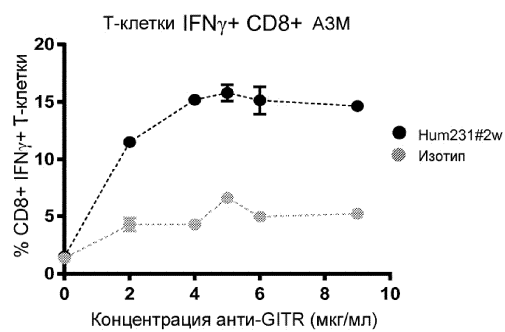
Фиг. 19С



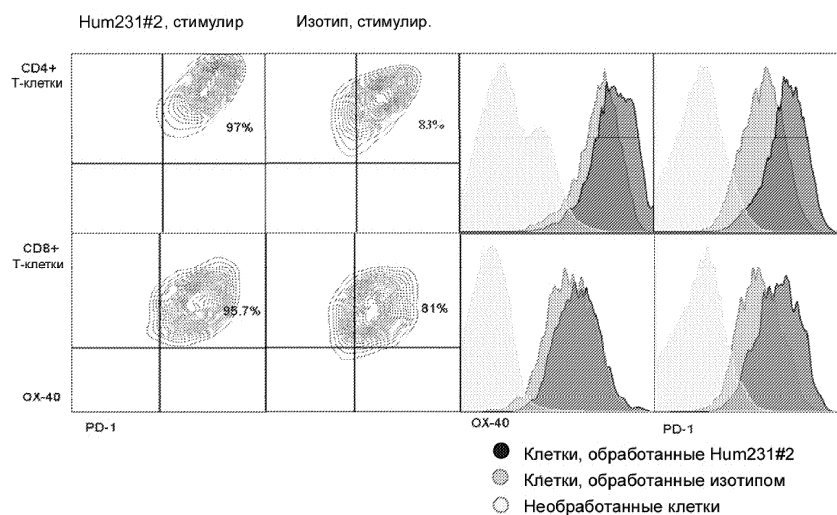
Фиг. 20А



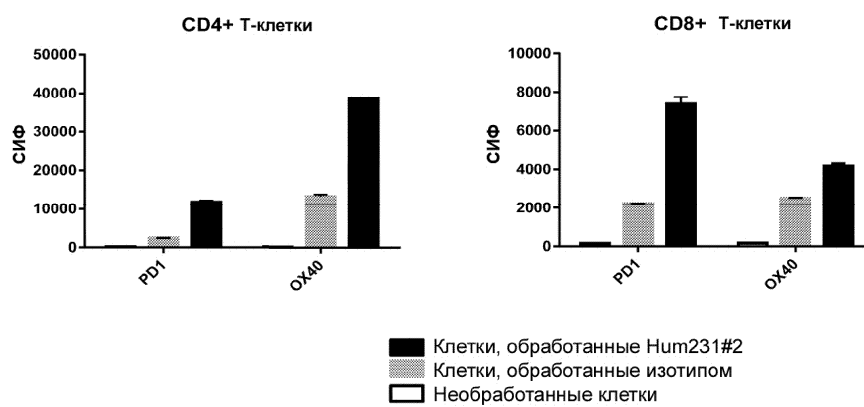
Фиг. 20В



Фиг. 20С



Фиг. 21А



Фиг. 21В

040077

		FR1			CDR1					FR2			CDR2														FR3			SEQ ID NO:					
Схема нумерации	IMGT	9	25		32	33	34	39	40		50	53		55	56	57	58	59	60	61	62	63	66	67	68	69	70	71	72	74		76		82	
	Кабат			H2	H3	H3	H3	H3	H3		H4	H4		H5	H5		H	H5	H5		H	H	H	H5	H6	H6	H6	H	H		H		H		
			H9	4	1	2	3	4	5		5	8		0	1	H52	52A	3	4	H55	56	57	58	9	0	1	2	H63	64	65		67		73	
hum231-32-15VH		A	G		D	Y	A	M	Y		L	I		V	I	R	T	Y	S	G	D	V	T	Y	N	Q	K	F	K	D		A		K	37
		X1	X2		X3	X4	X5				X6	X7		X8	X9		X10		X11	X12	X13						X14	X15		X16		X17			
Дизайн		A	G		D	Y	A	M	Y		L	I		V	I	R	T	Y	S	G	D	V	T	Y	N	Q	K	F	K	D		A		K	38
		T	A		E	V	H			M	M		L		K		F				E	L	S					Q	R		V		T		
					G											Q													G						
Вариант	D03	A	A		G	Y	A	M	Y		M	I		L	I	R	T	Y	S	G	G	V	T	Y	N	Q	K	F	Q	G		V		T	39
	D05	A	G		G	Y	A	M	Y		M	I		V	I	R	T	F	S	G	D	V	T	Y	N	Q	K	F	R	G		V		T	40
	D07	T	G		E	Y	A	M	Y		M	I		L	I	R	T	F	S	G	E	V	T	Y	N	Q	K	F	K	D		V		T	41
	D08	T	G		G	Y	A	M	Y		L	I		V	I	K	T	Y	S	G	G	V	T	Y	N	Q	K	F	R	G		V		K	42
	D09	A	G		G	Y	A	M	H		L	M		L	I	R	T	Y	S	G	G	V	S	Y	N	Q	K	F	R	E		A		T	43
	E01	T	A		D	Y	A	M	Y		L	I		V	I	R	T	F	S	G	D	L	T	Y	N	Q	K	F	Q	D		V		T	44
	F09	A	A		E	Y	A	M	H		L	M		L	I	R	T	Y	S	G	G	V	S	Y	N	Q	K	F	Q	G		A		T	45
	F10	T	A		D	Y	A	M	Y		L	I		V	I	R	T	Y	S	G	G	V	T	Y	N	Q	K	F	Q	G		V		T	46
	G01	T	G		D	Y	A	M	Y		M	M		V	I	R	T	Y	S	G	D	V	S	Y	N	Q	K	F	R	G		V		T	47
	G05	A	A		E	Y	A	M	Y		L	M		L	I	R	T	Y	S	G	G	V	S	Y	N	Q	K	F	R	D		V		K	48
	B07	A	A		G	Y	A	M	Y		M	M		V	I	R	T	F	S	G	G	V	T	Y	N	Q	K	F	R	G		A		T	49
	C03	T	G		D	Y	A	M	Y		M	I		V	I	K	T	Y	S	G	G	V	T	Y	N	Q	K	F	K	D		A		T	50
	F07	T	G		D	Y	A	M	Y		L	I		V	I	R	T	F	S	G	E	V	T	Y	N	Q	K	F	Q	E		V		A	51
	D11	T	A		E	Y	A	M	Y		M	I		V	I	R	T	F	S	G	G	V	T	Y	N	Q	K	F	Q	E		V		K	52
	F08	A	A		E	Y	A	M	H		L	M		V	I	R	T	Y	S	G	G	V	S	Y	N	Q	K	F	Q	E		V		T	53

Фиг. 22А

		CDR1														FR2				CDR2										FR3				CDR3										SEQ ID NO:																		
Схема нумерации	IMGT	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	43	44	52	56	57	58	66	67	68	69	77	78	94	95	103	105	106	107	108	109	110	111																					
	Кабат	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L																			
hum231-32-15VK		K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	L	Q	H	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	54																		
		X1														X2				X3				X4										X5				X6				X7				X8				X9												
Дизайн ML39		K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	L	Q	H	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T																			
		S														S				H				L										T				V				Q				Y				E				F				S				
Вариант	D03	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	H	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	V	Q	H	Q	N	E	Y	S	Y	P	Y	T	56																		
	D05	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	H	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	V	Q	Y	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	57																		
	D07	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	L	Q	H	Q	N	E	Y	S	Y	P	Y	T	58																		
	D08	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	L	Q	Y	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	59																		
	D09	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	V	Q	H	Q	N	E	Y	S	F	P	Y	T	60																		
	E01	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	L	Q	Y	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	61																		
	F09	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	V	Q	H	Q	N	D	Y	S	F	P	Y	T	62																		
	F10	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	V	Q	H	Q	N	D	Y	S	F	P	Y	T	63																		
	G05	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	H	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	V	Q	H	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	64																		
	п.а.	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	V	Q	H	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	65																		
	G09	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	H	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	V	Q	H	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	66																		
	C11	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	L	Q	H	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	67																		
F02	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	L	Q	Y	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	68																			
F03	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	M	W	A	S	T	R	E	S	S	G	L	Q	Y	Q	N	D	Y	S	Y	P	Y	T	69																			
D07.2	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	T	G	L	Q	Y	Q	N	D	Y	S	F	P	Y	T	70																			
F05	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Q	Q	L	W	A	S	T	R	E	S	S	G	L	Q	H	Q	N	D	Y	S	F	P	Y	T	71																			

Фиг. 22В

ID антитела	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO:	Число лишних аминокислот зародышевой линии	Средн. относительная аффинность vs. 231-32-15 (%)
pab1964	BADD427-2616	249	BADD427-2631	435	4	95
pab1965	BADD427-2617	251	BADD427-2632	437	0	93
pab1966	BADD427-2619	254	BADD427-2634	440	4	91
pab1967	BADD427-2620	255	BADD427-2635	441	4	90
pab1968	BADD427-2621	259	BADD427-2636	444	4	84
pab1969	BADD427-2622	276	BADD427-2637	458	6	79
pab1970	BADD427-2623	277	BADD427-2638	459	4	77
pab1971	BADD427-2624	280	BADD427-2639	453	3	73
pab1972	BADD427-2625	284	BADD427-2640	463	3	72
pab1973	BADD427-2626	304	BADD427-2641	519	3	72
pab1975	BADD427-2622	276	BADD427-2634	440	8	68
pab1976	BADD427-2622	276	BADD427-2636	444	8	67
pab1977	BADD427-2622	276	BADD427-2644	453	8	66
pab1979	BADD427-2630	345	BADD427-2634	440	8	63
pab1980	BADD427-2630	345	BADD427-2636	444	8	62
pab1981	BADD427-2630	345	BADD427-2644	453	8	58
pab1983	BADD427-2616	249	BADD427-2634	440	7	16

Фиг. 23

ID антитела	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
1	H1916A01	215	K1916A01	400
2	H1916A03	217	K1916A03	401
3	H1916A04	218	K1916A04	402
4	H1916A05	219	K1916A05	403
5	H1916A06	220	K1916A06	404
6	H1916A07	221	K1916A07	405
7	H1916A08	222	K1916A08	406
8	H1916A09	223	K1916A09	407
9	H1916A10	224	K1916A10	408
10	H1916A11	225	K1916A11	409
11	H1916A12	226	K1916A12	410
12	H1916B01	227	K1916B01	411
13	H1916B03	228	K1916B03	413
14	H1916B04	229	K1916B04	414
15	H1916B05	230	K1916B05	415
16	H1916B06	231	K1916B06	416
17	H1916B08	232	K1916B08	418
18	H1916B09	233	K1916B09	419
19	H1916B10	234	K1916B10	420
20	H1916B12	236	K1916B12	421
21	H1916C03	237	K1916C03	423
22	H1916C04	238	K1916C04	424
23	H1916C05	239	K1916C05	425
24	H1916C06	240	K1916C06	426
25	H1916C07	241	K1916C07	427
26	H1916C08	242	K1916C08	428
27	H1916C09	243	K1916C09	429
28	H1916C10	244	K1916C10	430
29	H1916C11	245	K1916C11	431
30	H1916C12	246	K1916C12	432
31	H1916D01	247	K1916D01	433
32	H1916D02	248	K1916D02	434
33	H1916D03	249	K1916D03	435
34	H1916D04	250	K1916D04	436
35	H1916D05	251	K1916D05	437
36	H1916D06	252	K1916D06	438
37	H1916D07	253	K1916D07	439
38	H1916D08	254	K1916D08	440
39	H1916D09	255	K1916D09	441
40	H1916D10	256	K1916D10	442

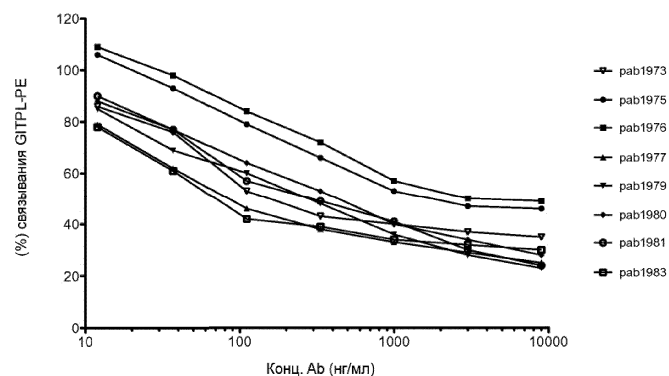
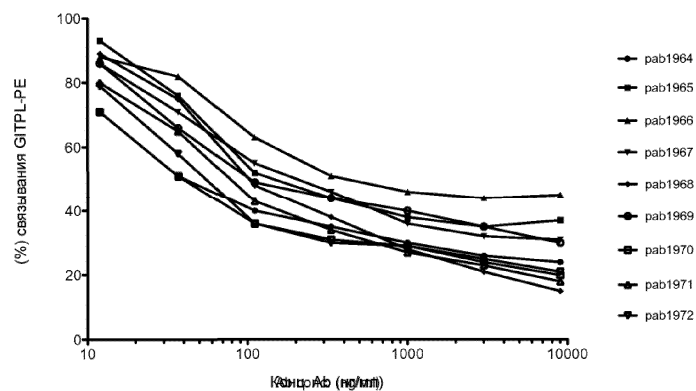
Фиг. 24А

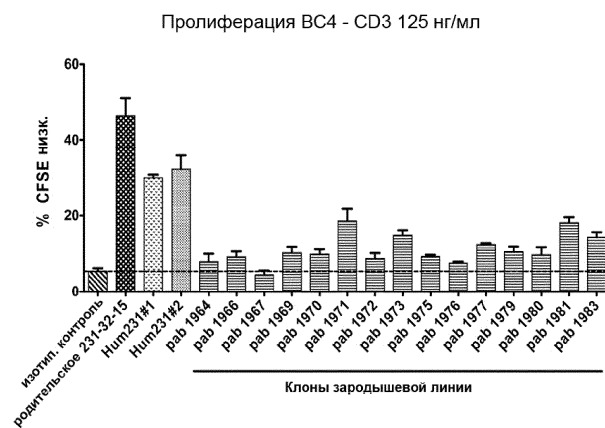
ID антитела	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
41	H1916D12	258	K1916D12	443
42	H1916E01	259	K1916E01	444
43	H1916E03	261	K1916E03	445
44	H1916E04	262	K1916E04	446
45	H1916E05	263	K1916E05	447
46	H1916E06	264	K1916E06	448
47	H1916E08	265	K1916E08	450
48	H1916E10	267	K1916E10	451
49	H1916E11	268	K1916E11	452
50	H1916F03	270	K1916F03	454
51	H1916F04	271	K1916F04	455
52	H1916F05	272	K1916F05	456
53	H1916F06	273	K1916F06	457
54	H1916F09	276	K1916F09	458
55	H1916F10	277	K1916F10	459
56	H1916G01	280	K1916G01	460
57	H1916G02	281	K1916G02	461
58	H1916G04	283	K1916G04	462
59	H1916G05	284	K1916G05	463
60	H1916G06	285	K1916G06	464
61	H1917A02	287	K1917A02	467
62	H1917A03	288	K1917A03	468
63	H1917A05	290	K1917A05	469
64	H1917A06	291	K1917A06	470
65	H1917A09	294	K1917A09	471
66	H1917A11	296	K1917A11	472
67	H1917A12	297	K1917A12	473
68	H1917B01	298	K1917B01	474
69	H1917B02	299	K1917B02	475
70	H1917B04	301	K1917B04	476
71	H1917B07	304	K1917B07	477
72	H1917B12	305	K1917B12	481
73	H1917C01	306	K1917C01	482
74	H1917C03	308	K1917C03	483
75	H1917C09	313	K1917C09	484
76	H1917C10	314	K1917C10	485
77	H1917C11	315	K1917C11	486
78	H1917D01	316	K1917D01	488
79	H1917D04	319	K1917D04	489
80	H1917D07	320	K1917D07	490

Фиг. 24В

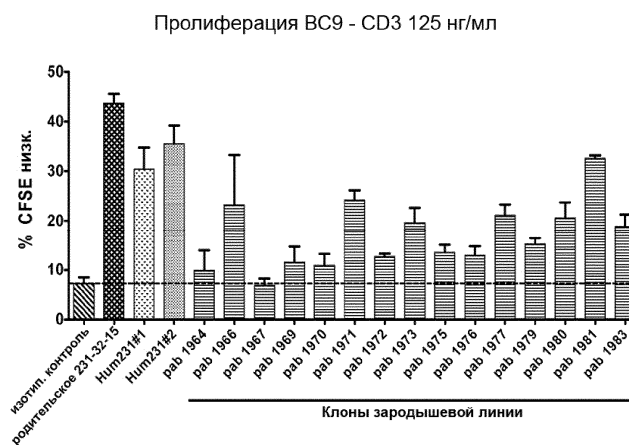
ID антитела	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
81	H1917D09	322	K1917D09	491
82	H1917D10	323	K1917D10	492
83	H1917D11	324	K1917D11	493
84	H1917D12	325	K1917D12	494
85	H1917E02	327	K1917E02	495
86	H1917E03	328	K1917E03	496
87	H1917E08	333	K1917E08	497
88	H1917E11	336	K1917E11	498
89	H1917F01	338	K1917F01	499
90	H1917F02	339	K1917F02	500
91	H1917F03	340	K1917F03	501
92	H1917F05	342	K1917F05	502
93	H1917F06	343	K1917F06	503
94	H1917G01	350	K1917G01	504
95	H1917G05	354	K1917G05	505
96	H1917G06	355	K1917G06	506
97	H1917G07	356	K1917G07	507
98	H1917G09	358	K1917G09	508
99	H1917G10	359	K1917G10	509
100	H1917G11	360	K1917G11	510
101	H1917H01	362	K1917H01	511
102	H1917H02	363	K1917H02	512
103	H1917H04	364	K1917H04	513
104	H1917H06	365	K1917H06	515
105	H1917H07	366	K1917H07	516
106	H1917H08	367	K1917H08	517
107	H1917H09	368	K1917H09	518

Фиг. 24С

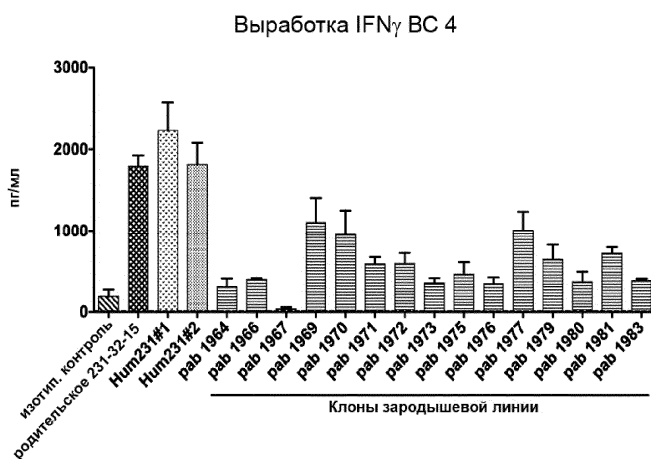




Фиг. 26А

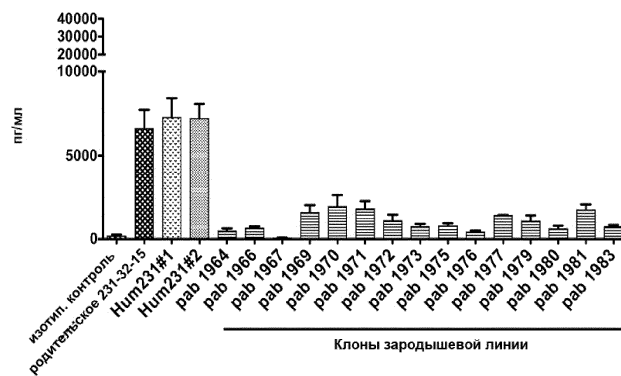


Фиг. 26В

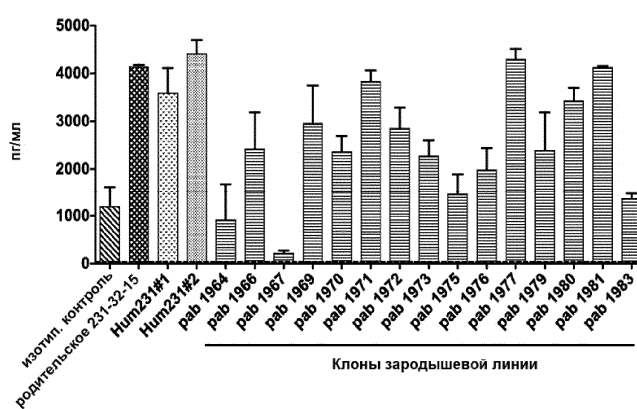


Фиг. 27А

Выработка IL-10 BC 4

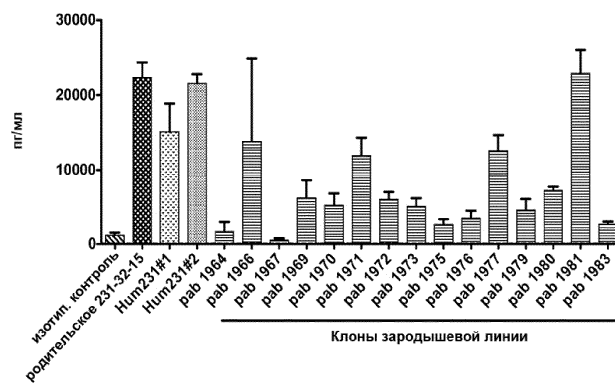


Фиг. 27В

Выработка IFN γ BC 9

Фиг. 28А

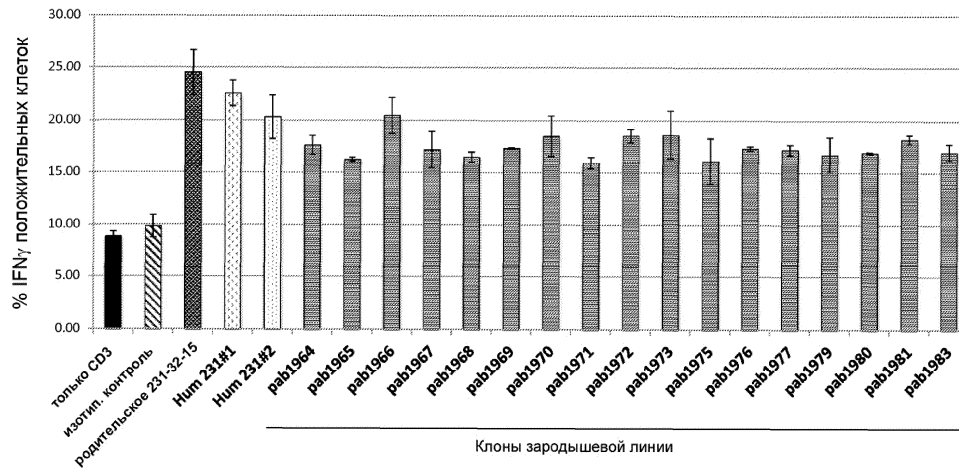
Выработка IL-10 BC 9



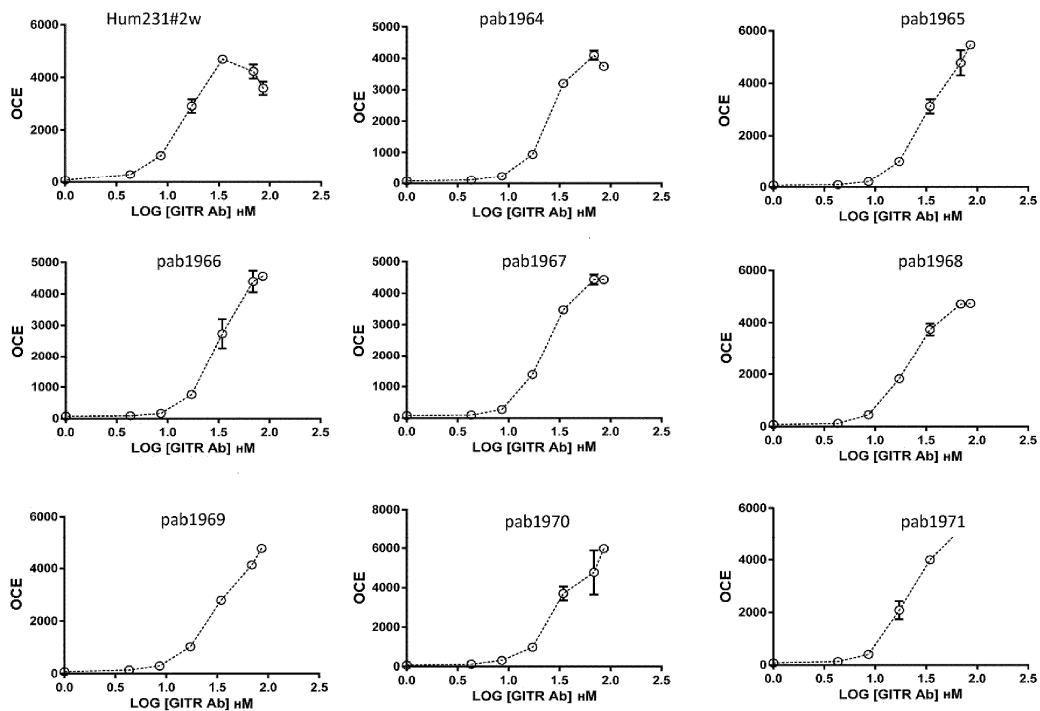
Фиг. 28В

Выработка $\text{IFN}\gamma$ BC 13

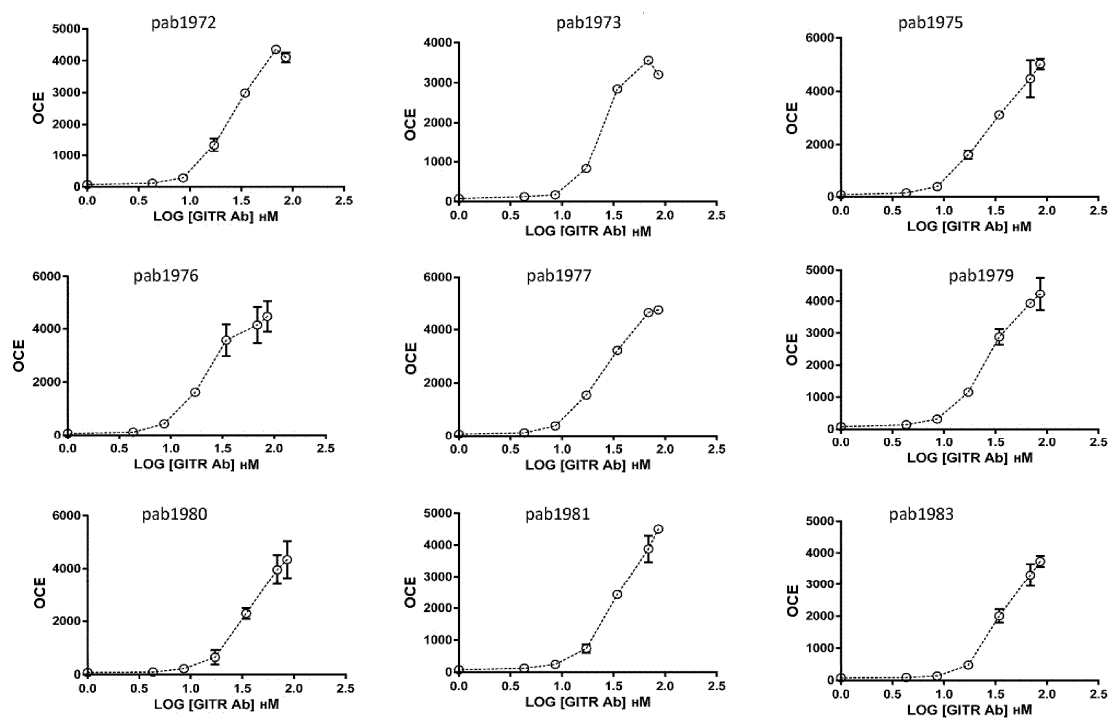
Фиг. 29А

Выработка $\text{IFN}\gamma$ BC 18

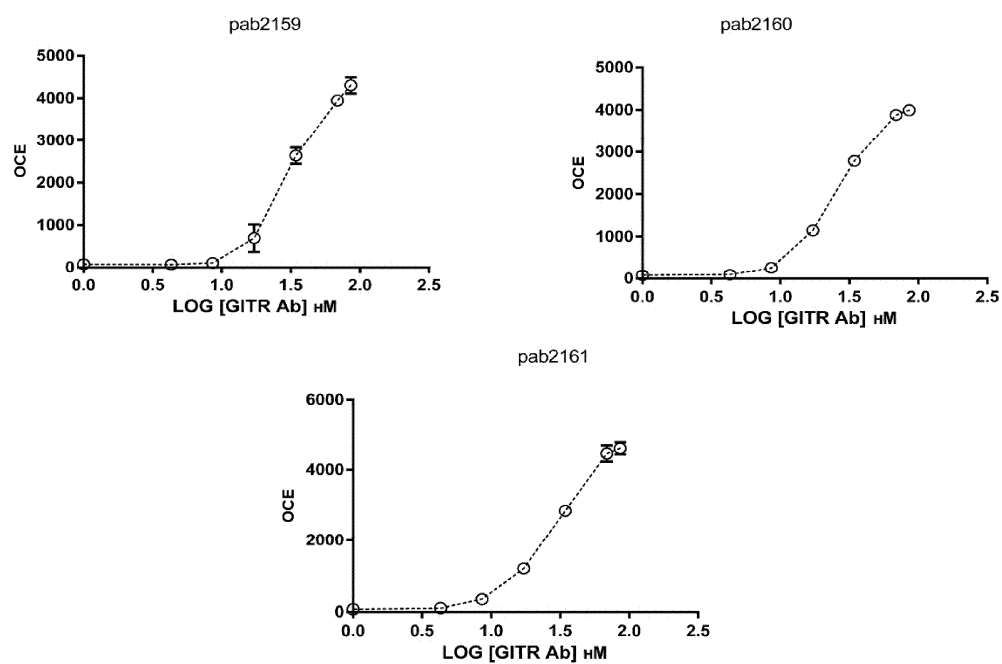
Фиг. 29В



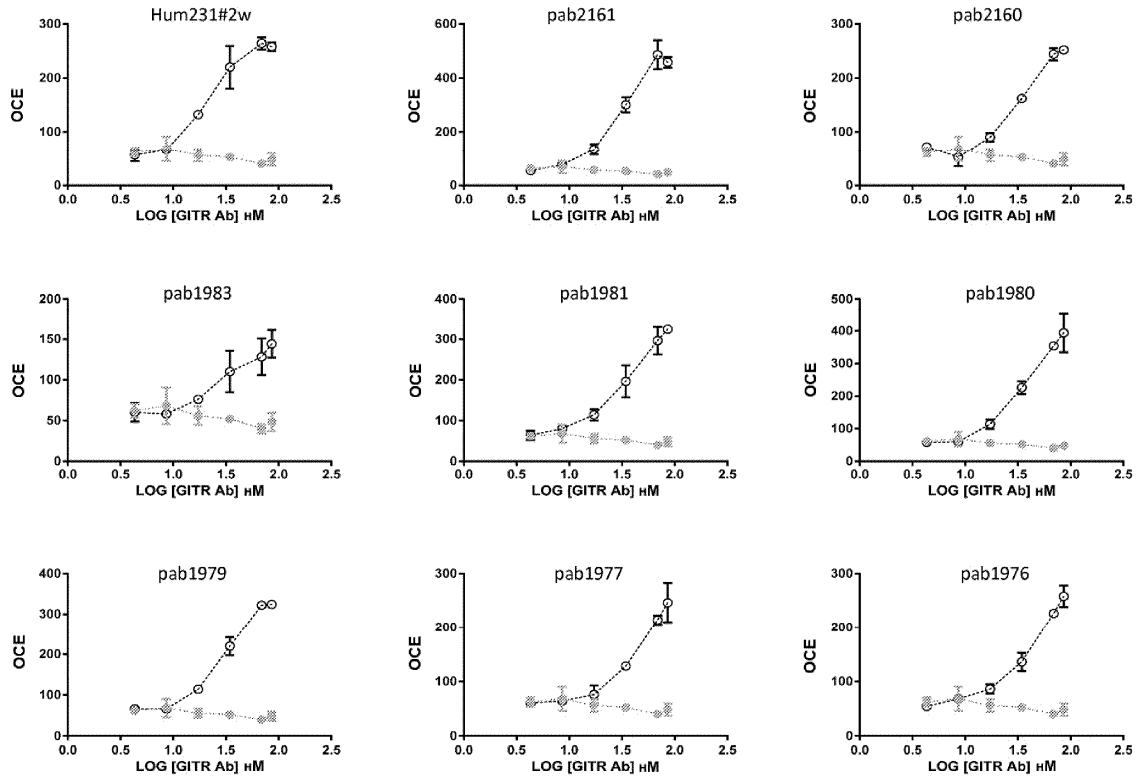
Фиг. 30А



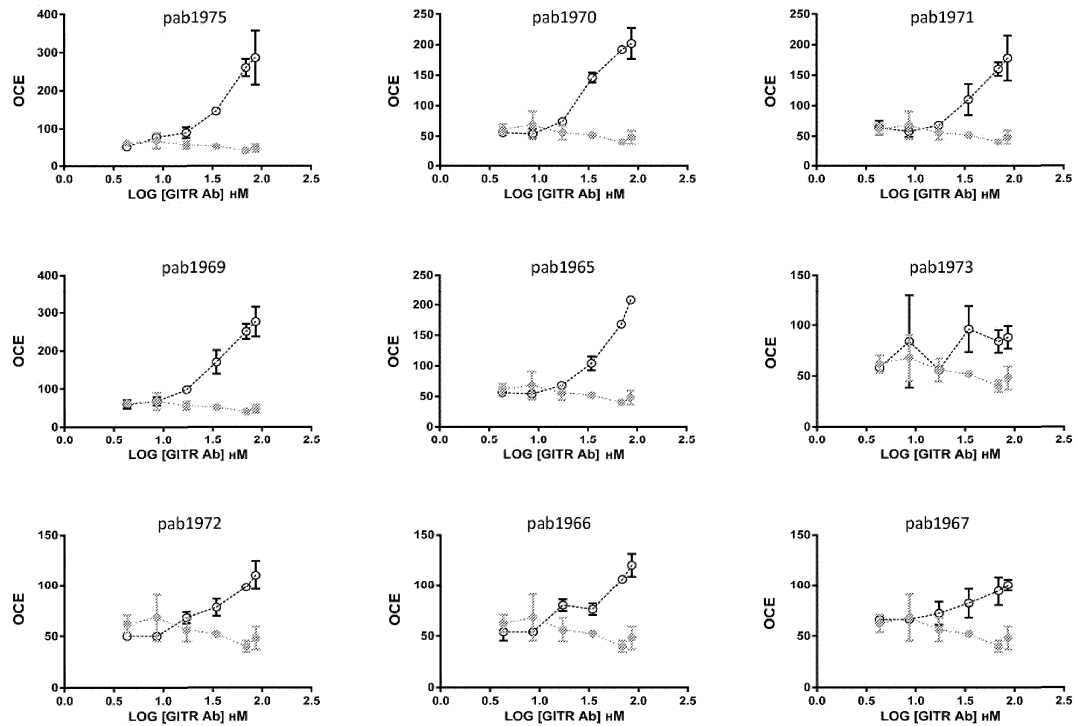
Фиг. 30B



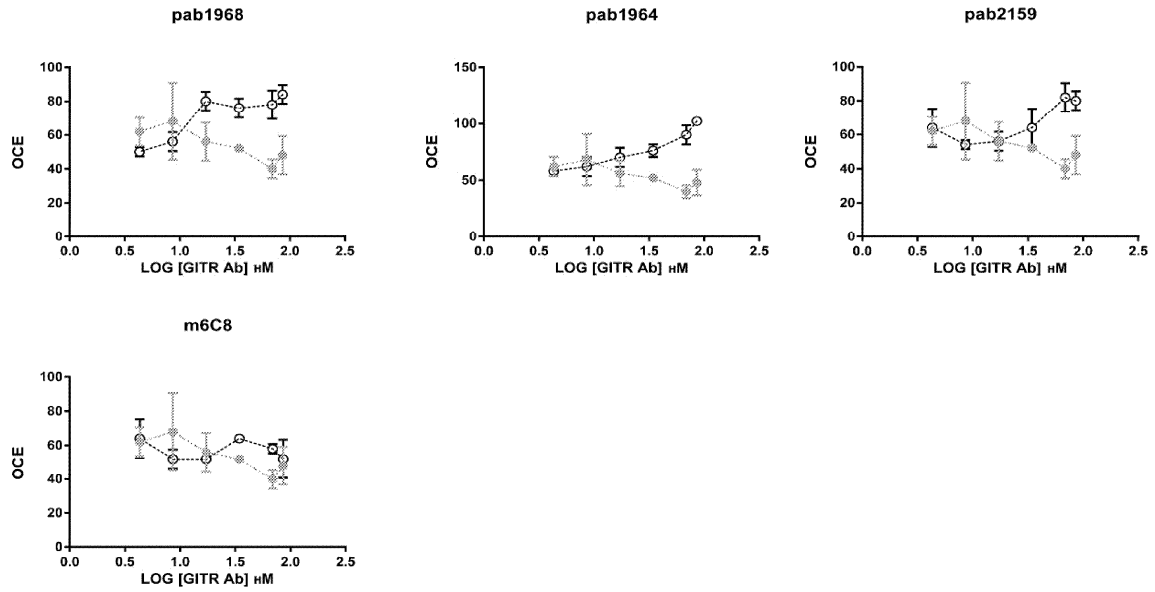
Фиг. 30C



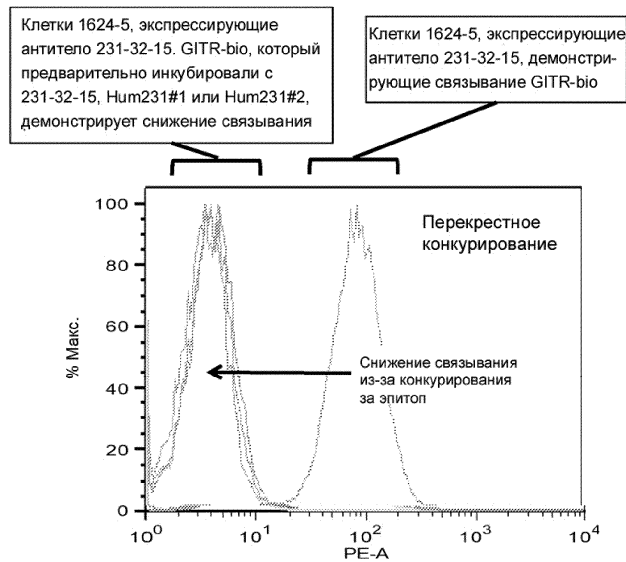
Фиг. 30D



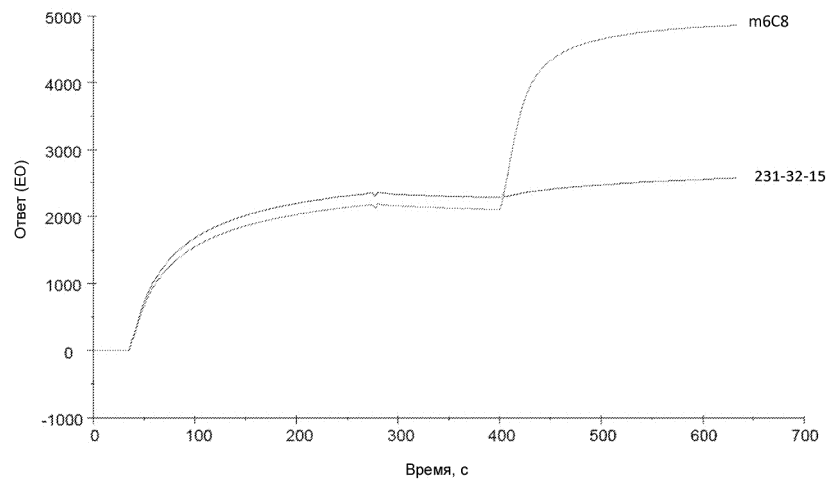
Фиг. 30E



Фиг. 30F



Фиг. 31



Фиг. 32

```

MAQHGMAGAFRALCGLLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGTARCCRVHTTRCCRDYFDEECCSEWDCMCVQPEFHCG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
10      20      30      40      50      60      70      80
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
huGfTR
2124B07_1155-Je curated.seq .....S.....
2124C01_1155-Je curated.seq .....Q.....S.N.....
2124C02_1155-Je curated.seq .....S.....
2124D03_1155-Je curated.seq .....A.....S.....
2124A01_1155-Je curated.seq .....D.....
2124A03_1155-Je curated.seq .....L.....D.....
2124A05_1155-Je curated.seq .....D.....
2124A11_1155-Je curated.seq .....D.....
2124A12_1155-Je curated.seq .....D.....
2124B01_1155-Je curated.seq .....V.....D.....Y.....
2124B04_1155-Je curated.seq .....D.....
2124B12_1155-Je curated.seq .....D.....V.....
2124C03_1155-Je curated.seq .....D.....
2124C08_1155-Je curated.seq .....D.....
2124C12_1155-Je curated.seq .....S.....D.....
2124A02_1155-Je curated.seq .....D.....R.....
2124A09_1155-Je curated.seq .....D.....R.....
2124A10_1155-Je curated.seq .....D.....R.....
2124B08_1155-Je curated.seq .....R.....
2124A04_1155-Je curated.seq .....C.....
2124A07_1155-Je curated.seq .....T.....C.....
2124B05_1155-Je curated.seq .....T.....C.....
2124B06_1155-Je curated.seq .....A.....C.....
2124B09_1155-Je curated.seq .....S.....C.....
2124D04_1155-Je curated.seq .....I.....R.....C.....
2124C10_1155-Je curated.seq .....S.....C.Q.....
2124A08_1155-Je curated.seq .....S.....S.....V.....
2124B02_1155-Je curated.seq .....K.....S.....V.....G.....
2124B03_1155-Je curated.seq .....V.....
2124A06_1155-Je curated.seq .....L.....
2124C04_1155-Je curated.seq .....L.....
2124C09_1155-Je curated.seq .....L.....

```

Фиг. 33А

```

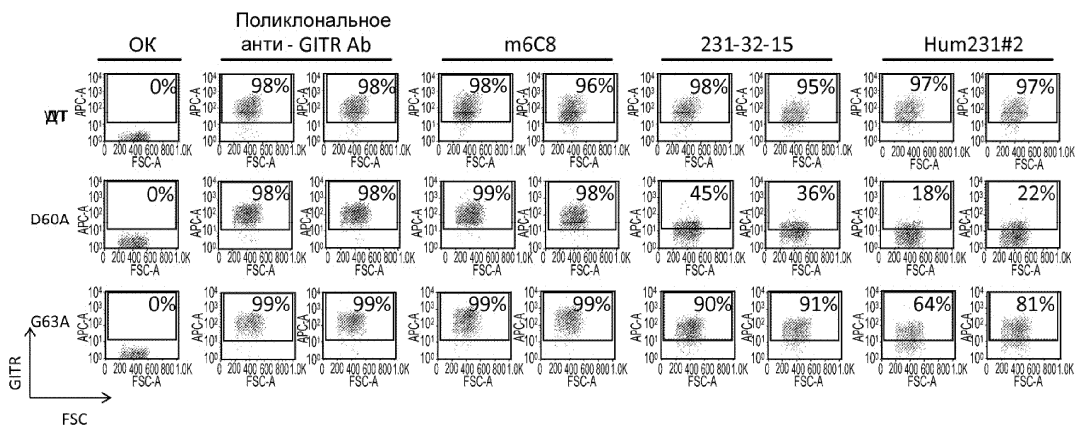
FHCGBPCTTCRHHPCFPFGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTICTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEP
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
80      90      100     110     120     130     140     150     160
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
huGfTR
2124B07_1155-Je curated.seq .....
2124C01_1155-Je curated.seq .....
2124C02_1155-Je curated.seq .....H...
2124D03_1155-Je curated.seq .....Q.....
2124A01_1155-Je curated.seq .....
2124A03_1155-Je curated.seq .....
2124A05_1155-Je curated.seq .....
2124A11_1155-Je curated.seq .....
2124A12_1155-Je curated.seq .....
2124B01_1155-Je curated.seq Y.....I.....
2124B04_1155-Je curated.seq .....V.....
2124B12_1155-Je curated.seq .....
2124C03_1155-Je curated.seq .....M.....
2124C08_1155-Je curated.seq .....
2124C12_1155-Je curated.seq .....
2124A02_1155-Je curated.seq .....I.....
2124A09_1155-Je curated.seq .....
2124A10_1155-Je curated.seq .....
2124B08_1155-Je curated.seq .....
2124A04_1155-Je curated.seq .....T.....
2124A07_1155-Je curated.seq .....
2124B05_1155-Je curated.seq .....
2124B06_1155-Je curated.seq .....C.....
2124B09_1155-Je curated.seq .....
2124D04_1155-Je curated.seq .....
2124C10_1155-Je curated.seq .....D.....
2124A08_1155-Je curated.seq .....D.....
2124B02_1155-Je curated.seq .....
2124B03_1155-Je curated.seq .....C.....
2124A06_1155-Je curated.seq .....H...
2124C04_1155-Je curated.seq .....
2124C09_1155-Je curated.seq .....

```

Фиг. 33В

Мутант	номер конструкции	Hum231#2	pab1967	pab1975	pab1979	m6C8
T54A	4526	+	+	+	+	+
T55A	4527	+	+	+	+	+
R56A	4528	+	+	+	+	+
C57A	4529	+	+	+	+	+
C58A	4530	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
R59A	4531	+	+	+	+	+
D60A	4532	-	+/-	+/-	+/-	+
Y61A	4533	+	+	+	+	+
P62A	4534	+	+	+	+	+
G63A	4535	+/-	+/-	+/-	+/-	+
E64A	4536	+	+	+	+	+
E65A	4537	+	+	+	+	+
C66A	4538	+	+	+	+	+
C67A	4539	+	+	+	+	+
S68A	4540	+	+	+	+	+
E69A	4541	+	+	+	+	+
W70A	4542	+	+	+	+	+
D71A	4543	+	+	+	+	+
C72A	4544	+	+	+	+	+
M73A	4545	+	+	+	+	+
C74A	4546					
V75A	4547	+	+	+	+	+
Q76A	4548	+	+	+	+	+
P28A	4595	+	+	+	+	+
T29A	4596	+	+	+	+	+
G30A	4597	+	+	+	+	+
G31A	4598	+	+	+	+	+
P32A	4599	+	+	+	+	+

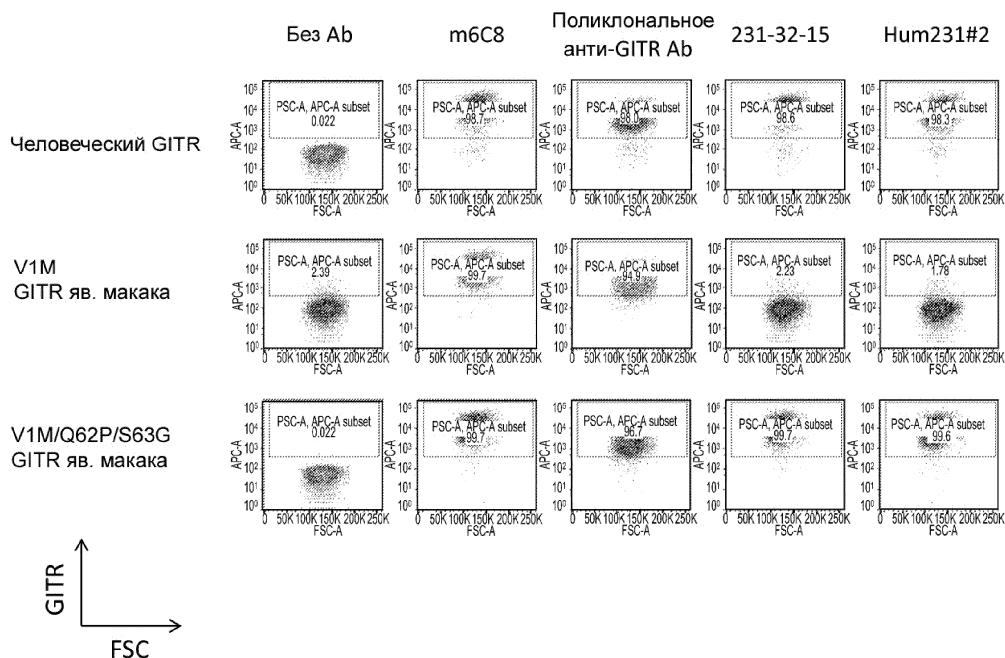
Фиг. 34А



Фиг. 34В

	MA RHGAMCAGCT LCC LALL CAAS LGQRPTGGPGCGPGRLL L L G T G K D A R C C R V H P T R C C R D Y P G E E C C S E W D C V C V Q P E F H	10	20	30	40	50	60	70	80
человеческий G1TR	MAQHGMAGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLL L L G T G D A R C C R V H T T R C C R D Y P G E E C C S E W D C M C V Q P E F H	80							
V1M/Q62P/S63G G1TR яв. макака	..R...C.CGT..C.....A.....K.....P.....V.....	80							
V1M G1TR яв. макака	..R...C.CGT..C.....A.....K.....P.....Q.S.....V.....	80							
	C G N P C C T T C Q H H P C P S G G Q V Q P Q G K F S F G F R C V D C A L G T F S R G H D G H C K P W T D C T Q F G F L T V F P G N K T H N A V C V P G S P P A	90	100	110	120	130	140	150	160
человеческий G1TR	C G D P C C T T C R H H P C P P G Q G V Q S Q G K F S F G F Q C I D C A S G T F S G G H E G H C K P W T D C T Q F G F L T V F P G N K T H N A V C V P G S P P A	160							
V1M/Q62P/S63G G1TR яв. макака	..N...Q...S...P.....R.V...L...R...D.....	160							
V1M G1TR яв. макака	..N...Q...S...P.....R.V...L...R...D.....	160							
	E P P G W L T I V L L A V A A C V L L T S A Q L G L H I W Q L G ----- K T Q L L L E V P P S T E D A S S C Q F P E E E R G E R L A E E K G R L G D L W	170	180	190	200	210	220	230	240
человеческий G1TR	E P L G W L T V L L A V A A C V L L T S A Q L G L H I W Q L R S Q C M W P R E T Q L L L E V P P S T E D A R S C Q F P E E E R G E R S A E E K G R L G D L W	240							
V1M/Q62P/S63G G1TR яв. макака	..P...I.....G-----K.....S.....L.....	233							
V1M G1TR яв. макака	..P...I.....G-----K.....S.....L.....	233							
	V-								
человеческий G1TR	V.								242
V1M/Q62P/S63G G1TR яв. макака	..								235
V1M G1TR яв. макака	.								234

Фиг. 35A



Фиг. 35B



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2