

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391892 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.21

(22) Дата подачи заявки
2022.02.01

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ GITR И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/144,732; 63/297,968

(32) 2021.02.02; 2022.01.10

(33) US

(86) PCT/US2022/014752

(87) WO 2022/169766 2022.08.11

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Кейн Пол Френсис, Ласерте Мелинда
Энн, Ли Стейси Линн, Вердино Петра,
Вортингер Марк Эндрю (US)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, которые связываются с GITR человека, фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, а также способам применения таких соединений.

A1

202391892

202391892

A1

АНТАГОНИСТЫ GITR И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

[1] Настоящее изобретение в целом относится к биологии и медицине, и более конкретно оно относится к антагонистам индуцируемого глюкокортикоидами TNFR-родственного белка (GITR), также известного как член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 18 (TNFRSF18), в частности, к моновалентным форматам антагонистов, которые лишены связывания с рецептором Fc-гамма (FcγR) и не способны стимулировать агонизм GITR. Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим указанные антагонисты, и их применению при лечении аутоиммунных заболеваний или нарушений.

[2] GITR является членом суперсемейства TNFR и, как известно, экспрессируется на различных иммунных клетках, включая регуляторные Т-клетки (Treg) и активированные Т-клетки. См., например, Tian, J., et al., (2020) *Front. Immunol.*, 11:1-7. GITR представляет собой однопроходный трансмембранный белок типа I, и его внеклеточный домен (ВКД) состоит из трех богатых цистеином доменов, которые типичны для суперсемейства TNFR.

[3] GITR мультимеризуется и активируется при взаимодействии со своим тримеризованным лигандом GITRL (TNFSF18), что приводит к индукции активации NFκB посредством TRAF2/TRAF5. См., например, Pedros, C., Altman, A., and Kong, K. (2018) *Front. Immunol.* 9:2412; и Snell, L.M., et al., (2010) *J. Immunol.*, 185(12):7223-7234.

Последствия GITRL-индуцированной передачи сигналов с участием GITR включают костимуляцию пролиферации Т-клеток и высвобождение цитокинов, а также отмену подавляющих эффектов Treg. Также было показано, что связывание антител может оказывать агонистическое действие на GITR и что данная активация GITR может быть дополнительно усилена агонистическим антителом или связыванием GITRL-Fc с FcγR; как полагают, это усиление опосредуется повышенной авидностью или мультимеризацией рецептора. Таким образом, антагонист GITR, вероятно, будет проявлять агонистическую активность, если он связан на поверхности, возможно, посредством связывания FcγR на клеточной поверхности, что приводит к мультимеризации GITR и последующей активации. Таким образом, желательным является фрагмент моновалентного антитела против GITR, который эффективно блокирует связывание GITRL с его рецептором и предотвращает активацию рецептора, а также не способен связываться в значительной степени с FcγR. Самый простой способ обеспечить отсутствие взаимодействия с FcγR заключается в создании фрагментов антител, которые полностью лишены домена Fc. Однако известно, что фрагменты антитела, которые полностью лишены домена Fc, такие

как Fab, имеют короткий период полужизни ($t_{1/2}$), что создает проблемы при их применении в качестве терапевтического агента.

[4] Существует несколько стратегий продления $t_{1/2}$ биотерапевтических средств, которые могут улучшить их фармакокинетические (ФК) и/или фармакодинамические (ФД) профили. В таких стратегиях, как правило, используются объемные фрагменты или опосредуемая неонатальным рецептором Fc (FcRn) рециркуляция. Таким образом, антитела (Ат) или их фрагменты (например, Fab, Fc и т.д.); полимеры, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловая кислота (PSA), гиалуроновая кислота (НА) и гидроксипропилкрахмал (HES); жирные кислоты и другие липиды; N- или O-гликозилирование; и сывороточный альбумин или другие белки плазмы (такие как трансферрин) могут быть ковалентно и/или нековалентно связаны с конкретным биотерапевтическим средством для продления его периода полужизни.

[5] В Международной заявке на патент, опубликованной в рамках Договора о патентной кооперации (PCT) как WO 2017/096189 (Agenus), раскрыты, среди прочего, антагонистические антитела против GITR человека (включая, но не ограничиваясь ими, биспецифичные антитела, например, антитела, которые содержат первый антигенсвязывающий домен, который связывается с GITR человека, и второй антигенсвязывающий домен, который не связывается специфично с антигеном, экспрессируемым иммунной клеткой человека), а также способы их применения. Согласно некоторым вариантам реализации и в некоторых анализах *in vitro* определенные антитела против GITR человека, раскрытые в WO 2017/096189, ведут себя как антагонисты. Однако в более поздних сообщениях, опубликованных заявителем Agenus, описан INCAGN1876, также известный как рагифилимаб, который представляет собой агонистическое антитело для GITR. См., например, Gonzalez, Ana M., et al., AACR Annual Meeting 2017; April 1-5, 2017; Washington, DC, Abstract 3643.

[6] Таким образом, все еще существует потребность в антителах против GITR человека, которые 1) связывают GITR человека с желаемыми скоростями ассоциации и диссоциации для оптимальной антагонистической активности, 2) блокируют связывание GITRL с GITR и предотвращают активацию GITR, 3) лишены детектируемой стимуляции GITR человека, 4) имеют достаточные фармакокинетические (ФК) и/или фармакодинамические (ФД) профили и доказуемую эффективность *in vivo* в качестве монотерапии для лечения и/или предотвращения аутоиммунных нарушений, аллергического заболевания, астмы, атопического дерматита (АтД), воспаления суставов, артрита, ревматоидного артрита (РА) или других воспалительных нарушений, таких как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), болезнь Крона (БК) и/или язвенный колит

(ЯК), 5) не вызывают значительной индукции высвобождения цитокинов, 6) обладают низкой иммуногенностью (т.е. достаточно неиммуногенны у яванских макаков и/или человека), и 7) демонстрируют физическую и химическую стабильность *in vitro* и *in vivo*, включая, но не ограничиваясь перечисленными, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, приемлемые для разработки и/или применения при лечении аутоиммунных нарушений, аллергического заболевания, астмы, АтД, воспаления суставов, артрита, РА или других воспалительных нарушений, таких как ВЗК, БК и/или ЯК.

[7] Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены новые соединения антагонистов GITR человека, которые 1) связывают GITR человека с желаемыми скоростями ассоциации и диссоциации для оптимальной антагонистической активности, 2) блокируют связывание GITRL с GITR и предотвращают активацию GITR, 3) лишены детектируемой стимуляции GITR человека, 4) имеют достаточные фармакокинетические (ФК) и/или фармакодинамические (ФД) профили и доказуемую эффективность *in vivo* в качестве монотерапии для лечения и/или предотвращения аутоиммунных нарушений, аллергического заболевания, астмы, атопического дерматита, воспаления суставов, артрита, ревматоидного артрита или других воспалительных нарушений, таких как ВЗК, БК и/или ЯК, 5) не вызывают значительной индукции высвобождения цитокинов, 6) обладают низкой иммуногенностью (т.е. достаточно неиммуногенны у яванских макаков и/или человека), и 7) демонстрируют физическую и химическую стабильность *in vitro* и *in vivo*, включая, но не ограничиваясь перечисленными, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, приемлемые для разработки и/или применения при лечении аутоиммунных нарушений, аллергического заболевания, астмы, АтД, воспаления суставов, артрита, РА или других воспалительных нарушений, таких как ВЗК, БК и/или ЯК.

[8] Согласно настоящему изобретению предложены соединения, содержащие антигенсвязывающий фрагмент против GITR человека, содержащий: 1) переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 7, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

[9] В некоторых случаях соединения, описанные в настоящем документе, имеют формулу (от аминоконца (N-конец) к карбоксиконцу (C-конец)): X-L-M (где N-конец L слит с C-концом HC X и C-конец L слит с N-концом M); или X-L-M (где N-конец L слит с C-концом LC X и C-конец L слит с N-концом M); или M-L-X (где N-конец L слит с C-концом M и C-конец L слит с N-концом HC X);); или M-L-X (где N-конец L слит с C-концом M и C-конец L слит с N-концом LC X); где M представляет собой соединение, действующее как фрагмент, продлевающий $t^{1/2}$, L (если присутствует) представляет собой линкер, и X представляет собой фрагмент Fab антитела, который связывает GITR человека. В некоторых случаях M представляет собой альбуминсвязывающий VHH, и L может иметь аминокислотную последовательность, содержащую (GGGGQ)_n, где n может быть от 1 до 15, в частности, от примерно 4 до примерно 8. В других случаях M содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, и L может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11 или 12. В других случаях L может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен так, что L имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере от примерно 90% до примерно 99% сходства последовательности с любой из SEQ ID NO: 11 или 12.

[10] В раскрытии также описаны фармацевтические композиции, которые включают по меньшей мере одно соединение, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[11] Кроме того, в раскрытии описаны способы применения соединений и фармацевтических композиций в качестве лекарственных средств.

[12] Кроме того, в раскрытии описаны варианты применения соединений, описанных в настоящем документе, для изготовления лекарственных средств.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[13] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное раскрытие. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно применять на практике или при тестировании аналогов, фармацевтических композиций и способов, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и материалы.

[14] Кроме того, упоминание элемента с неопределенным артиклем (соотв. «а» или «an» в исходном тексте на английском языке) не исключает возможности присутствия более чем одного элемента, если контекст явно не требует наличия одного и только одного элемента. Соответственно, упоминание элемента с неопределенным артиклем (соотв. «а» или «an» в исходном тексте на английском языке) обычно означает «по меньшей мере один».

[15] *Определения*

[16] В настоящем документе «примерно» означает в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, заявленная концентрация, длина, молекулярная масса, рН, сходство последовательности, временные рамки, температура, объем и т. д. Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка величины типично в пределах 20%, более типично в пределах 10% и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, включенное в термин «примерно», будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

[17] В настоящем документе и при упоминании в отношении одного или более рецепторов «активность», «активировать», «активирующий» и тому подобное означает способность соединения, например, описанного в настоящем документе слияния, связываться с рецептором(ами) и индуцировать его(их) ответ, что измеряется с использованием анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

[18] В настоящем документе «аминокислота» означает молекулу, которая с химической точки зрения характеризуется наличием одной или более аминогрупп и одной или более карбоксильных групп и может содержать другие функциональные группы. Как известно в данной области техники, существует набор из двадцати аминокислот, которые обозначены как стандартные аминокислоты и могут использоваться в качестве строительных блоков для большинства пептидов/белков, продуцируемых любым живым существом. Аминокислотные последовательности по данному раскрытию содержат стандартные однобуквенные или трехбуквенные коды для двадцати встречающихся в природе аминокислот.

[19] В настоящем документе «аналог» означает соединение, такое как синтетический пептид или полипептид, которое активирует рецептор-мишень и вызывает по меньшей мере один эффект *in vivo* или *in vitro*, вызываемый нативным агонистом этого рецептора.

[20] Термин «антитело» в контексте настоящего документа относится к молекуле иммуноглобулина, которая связывает антиген. Варианты реализации антитела включают

моноклональное антитело, поликлональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело или конъюгированное антитело. Антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) и любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Примерное антитело представляет собой антитело типа иммуноглобулина G (IgG), состоящее из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), которые сшиты посредством межцепочечных дисульфидных связей. Аминоконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей включает вариабельную область из примерно 100-125 или более аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена.

10 Карбоксиконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит константную область, в первую очередь, отвечающую за эффекторную функцию. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи. Изотип IgG можно дополнительно разделить на

15 подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4).

[21] Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), перемежающиеся с участками, которые являются более консервативными и называются каркасными участками (FR). CDR экспонируются на поверхности белка и являются

20 важными участками антитела для специфичности связывания антигена. Каждая VL и VH состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В настоящей заявке три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков,

25 которые формируют специфичные взаимодействия с антигеном. Отнесение аминокислотных остатков к CDR может быть выполнено в соответствии с хорошо известными схемами, в том числе описанными у Kabat (Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia et al., «Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins»,

30 Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., «Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins», Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), North (North et al., «A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations», Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) или IMGT (международная база данных ImMunoGeneTics, доступная на сайте www.imgt.org; см. Lefranc et al., Nucleic Acids Res.

1999; 27:209-212). Определения CDR по North используют для антител против GITR человека, описанных в настоящем документе.

[22] Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части антитела, которая сохраняет способность специфично взаимодействовать с эпитопом антигена. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, Fab или Fab'. Фрагмент «Fab» состоит из полной легкой цепи антитела, содержащей переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL), а также переменной области тяжелой цепи (VH) и первого константного домена тяжелой цепи (CH1). Каждый фрагмент Fab является моновалентным в отношении связывания антигена, т.е. он имеет один антигенсвязывающий сайт. Фрагмент Fab' отличается от фрагмента Fab наличием нескольких дополнительных остатков на карбоксильном конце домена CH1, включая один или более остатков из шарнирной области антитела. Fab или Fab', описанные в настоящем документе, могут представлять собой Fab или Fab' человека или химерные Fab или Fab', которые содержат CL и CH1 человека.

[23] Термины «связывать» и «связывает» в контексте настоящего документа предназначены для обозначения, если не указано иное, способности белка или молекулы образовывать химическую связь или взаимодействие на основании притяжения с другим белком или молекулой, что приводит к близости двух белков или молекул, как определено обычными методами, известными в данной области техники.

[24] В настоящем документе «биотерапевтический» и т.п. означает соединения на основе аминокислот или нуклеиновых кислот, такие как антитела, факторы коагуляции, факторы свертывания крови, цитокины, ферменты, факторы роста, гормоны и их фрагменты, обладающие по меньшей мере одним видом терапевтической активности/применимости, а также терапевтические молекулы ДНК и/или РНК.

[25] В настоящем документе «консервативная замена» означает вариант референсного пептида или полипептида, который идентичен референсной молекуле, за исключением наличия одной или более консервативных аминокислотных замен в его аминокислотной последовательности. В целом, вариант, полученный путем консервативной модификации, включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична референсной аминокислотной последовательности. Более конкретно, консервативная замена относится к замене аминокислоты аминокислотой, имеющей подобные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость каркаса и т. д.), и оказывающей минимальное влияние на биологическую активность полученного путем замены пептида или полипептида.

Консервативные замены функционально подобных аминокислот хорошо известны в данной области техники, и поэтому нет необходимости в их исчерпывающем описании в настоящем документе.

[26] В настоящем документе «эффективное количество» означает количество или дозу

5 одного или более соединений, описанных в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении дозы нуждающемуся в этом индивидууму обеспечивает желаемый эффект у такого индивидуума, которому ставят диагноз или который проходит лечение (т. е. может приводить к клинически измеримому различию в состоянии индивидуума, например, 10 снижению одного или более показателей клинической активности заболевания, таких как индекс Американской коллегии ревматологов (ACR) 20, ACR50, ACR70; оценка активности заболевания (DAS); индекс площади и тяжести псориаза (PASI) 50, PASI75, PASI90, PASI100; индекс активности системной красной волчанки (SLEDAI); индекс активности заболевания по шкале Мейо (DAI); индекс активности болезни Крона (CDAI); 15 оценка по шкале Гебо (GS); гистопатологический индекс Робартса (RHI); индекс тяжести атопического дерматита (ADSI); и индекс активности синдрома Шегрена EULAR (ESSDAI). Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники путем применения известных методик и путем анализа результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного 20 количества для индивидуума рассматривается ряд факторов, включая, но не ограничиваясь перечисленными, вид млекопитающего, его размер, возраст и общее состояние здоровья, конкретное вовлеченное заболевание или нарушение, степень или вовлечение, или тяжесть заболевания или нарушения, ответ индивидуума, конкретное введенное соединение, способ введения, характеристики биодоступности вводимого 25 препарата, выбранную схему введения дозы, использование сопутствующих медикаментов и другие соответствующие обстоятельства.

[27] В настоящем документе «увеличенная продолжительность действия» означает,

что аффинность связывания и активность для слияния, включающего по меньшей мере одно соединение, описанное в настоящем документе, и биотерапевтическое средство, 30 описанное в настоящем документе, сохраняются в течение периода времени, превышающего период времени для нативного биотерапевтического средства, что позволяет вводить дозу по меньшей мере реже, чем ежедневно или даже три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Временной профиль действия можно измерить с помощью известных способов фармакокинетического анализа, таких как 35 способы, применяемые в приведенных ниже примерах.

[28] Термин «область Fc» в контексте настоящего документа относится к области антитела, которая содержит домены CH2 и CH3 тяжелой цепи антитела. Необязательно область Fc может включать часть шарнирной области или всю шарнирную область тяжелой цепи антитела.

5 [29] В настоящем документе «индуцируемый глюкокортикоидами TNFR-родственный белок» или «GITR», также известный как член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 18 (TNFRSF18), означает белок GITR, полученный или происходящий из любого вида, такого как вид млекопитающих, в частности, человек. GITR включает как нативный GITR (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, 10 вставки и/или замены нативного GITR). Одна последовательность для полноразмерного GITR человека (но без сигнального пептида) представлена в SEQ ID NO:20 (см. также номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № Q9Y5U5). Одна последовательность для ВКД GITR человека (но без сигнального пептида) представлена в SEQ ID NO:21.

[30] В настоящем документе «период полужизни» или « $t_{1/2}$ » означает время, 15 необходимое для того, чтобы половина некоторого количества соединения, такого как слитый белок, описанный в настоящем документе, была удалена из жидкости или другого физиологического пространства, такого как сыворотка или плазма индивидуума, с помощью биологических процессов. В качестве альтернативы, $t_{1/2}$ также может означать время, за которое некоторое количество такого слитого белка теряет половину своей 20 фармакологической, физиологической или радиологической активности.

[31] В настоящем документе «полумаксимальная эффективная концентрация» или «EC₅₀» означает концентрацию соединения, которая приводит к 50% активации/стимуляции конечной точки анализа, такой как кривая зависимости ответа от дозы.

25 [32] В настоящем документе «в комбинации с» означает введение по меньшей мере одного из слитых белков, описанных в настоящем документе, одновременно, последовательно или в виде единого комбинированного состава с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

[33] В настоящем документе «индивидуум, нуждающийся в этом» означает 30 млекопитающее, например, человека, имеющего состояние, заболевание, нарушение или симптом, требующий лечения или терапии, включая, например, перечисленные в настоящем документе. В частности, предпочтительный индивидуум, подлежащий лечению, представляет собой человека.

[34] В настоящем документе «длительного действия» означает, что аффинность 35 связывания и активность композиции, описанной в настоящем документе, сохраняется в

течение периода времени, превышающего период времени для нативного пептида или белка, что позволяет вводить дозу по меньшей мере реже, чем ежедневно или даже три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю или ежемесячно. Временной профиль действия соединений, описанных в настоящем документе, можно измерить с помощью известных способов фармакокинетического анализа, таких как те, которые описаны в приведенных ниже Примерах.

[35] Термины «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов, включая одноцепочечные и/или двухцепочечные молекулы, содержащие нуклеотиды, такие как молекулы ДНК, кДНК и РНК, включающие нативные, модифицированные нуклеотиды и/или их аналоги. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению также могут включать субстраты, включенные в них, например, ДНК- или РНК-полимеразой или синтетической реакцией.

[36] В настоящем документе «нестандартная аминокислота» означает аминокислоту, которая может естественным образом встречаться в клетках, но не участвует в синтезе пептидов. Нестандартные аминокислоты могут быть составляющими частями пептида и часто образуются путем модификации стандартных аминокислот в пептиде (т.е. посредством посттрансляционной модификации). Нестандартные аминокислоты могут включать D-аминокислоты, которые имеют абсолютную хиральность, противоположную указанным выше стандартным аминокислотам.

[37] В настоящем документе «олигомер» означает молекулу, имеющую несколько сходных или идентичных повторяющихся звеньев, которые могут быть получены из копий меньшей молекулы, ее мономера. Эти мономеры могут быть соединены сильными или слабыми связями, ковалентными или нековалентными (например, внутримолекулярными).

[38] В настоящем документе «пациент», «субъект» и «индивидуум» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и означают млекопитающее, в частности, человека. В некоторых случаях индивидуум дополнительно характеризуется наличием у него состояния, заболевания, нарушения или симптома, при которых может быть получена польза при введении соединения или композиции, описанной в настоящем документе.

[39] В настоящем документе «фармацевтически приемлемый буфер» означает любой из стандартных фармацевтических буферов, известных специалистам в данной области техники.

[40] В настоящем документе «сходство последовательностей» означает количественное свойство двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей биологических соединений, такое как, например, соответствие по всей длине или окну сравнения двух или более последовательностей.

5 Сходство последовательностей можно измерить по (1) проценту идентичности или (2) проценту сходства. Процент идентичности измеряет процент остатков, идентичных между двумя биологическими соединениями, деленный на длину самой короткой последовательности, тогда как процент сходства измеряет идентичность и, кроме того, включает в оценку пробелы в последовательностях и сходство остатков. Способы и
10 алгоритмы определения сходства последовательностей хорошо известны в данной области техники, и поэтому нет необходимости в их исчерпывающем описании в настоящем документе. Указанный процент идентичных положений нуклеотидов или аминокислот составляет по меньшей мере примерно 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше.

15 [41] В настоящем документе «осуществлять лечение» или «лечить» означает лечение и уход за индивидуумом, имеющим состояние, заболевание, нарушение или симптом, при которых показано введение соединения, описанного в настоящем документе, с целью ослабления, сдерживания, обращения вспять, замедления или остановки прогрессирования или уменьшения тяжести состояния, заболевания, нарушения или
20 симптома. Лечение включает введение соединения, описанного в настоящем документе, или композиции, содержащей соединение, описанное в настоящем документе, индивидууму для предотвращения начала симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений или устранения состояния, заболевания, нарушения или симптома. Лечение включает введение соединения, описанного в настоящем документе,
25 или композиции, содержащей соединение, описанное в настоящем документе, индивидууму с целью, например, уменьшения (или предотвращения) аутоиммунитета и/или снижения (или предотвращения) аллергического заболевания, астмы, атопического дерматита, воспаления суставов, артрита, ревматоидного артрита или других воспалительных нарушений, таких как ВЗК, БК и/или ЯК. Индивидуум, подлежащий
30 лечению, представляет собой млекопитающие, в частности, человека.

[42] Термин «терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего документа относится к количеству белка или нуклеиновой кислоты, или вектора, или композиции, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ у субъекта, например, снижение или ингибирование активности фермента или белка или уменьшение
35 симптомов, облегчение состояний, замедление или отсрочку прогрессирования

заболевания или предотвращение заболевания и т. д. В неограничивающем варианте реализации термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству белка или нуклеиновой кислоты, или вектора, или композиции, которое при введении субъекту является эффективным для по меньшей мере частичного облегчения, ингибирования, предотвращения и/или улучшения состояния или нарушения, или заболевания.

[43] В настоящем документе «гетеродимер вариабельной области тяжелой цепи» «VНН» или «фрагмент VНН» означает форму однодоменного антитела, в частности, фрагмент антитела, состоящий только из единственной мономерной вариабельной области тяжелой цепи антитела (HcAb), который имеет очень маленький размер примерно 15 кДа. В настоящем документе пришли к заключению, что соединения на основе сконструированного/модифицированного VНН можно применять в качестве фармакокинетического усилителя для увеличения продолжительности действия и/или улучшения $t_{1/2}$ биотерапевтических средств. Соединения на основе VНН, описанные в настоящем документе, связывают сывороточный альбумин; однако соединения на основе VНН можно применять для связывания IgG (включая домен Fc), неонатального рецептора Fc (FcRn) или других длительно существующих сывороточных белков. Таким образом, соединение на основе VНН можно применять для улучшения $t_{1/2}$ соединения, такого как пептид или белок, или даже других молекул, таких как, например, малые молекулы.

[44] Некоторые сокращения определены следующим образом: «ACR» относится к соотношению альбумин в моче/креатинин в моче; «AUC» относится к площади под кривой; «AUC_{0-inf}» относится к площади под кривой от времени 0 часов до бесконечности; «цАМФ» относится к циклическому аденозинмонофосфату; «C₀» относится к расчетной концентрации в плазме в нулевое время; «CL» относится к клиренсу после в/в введения; «CL/F» относится к кажущемуся клиренсу после п/к введения; «C_{max}» относится к максимальной наблюдаемой концентрации в плазме; «ЦМВ» относится к цитомегаловирусу; «ДНК» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте; «ВКД» относится к внеклеточному домену; «EDC» относится к гидрохлориду 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида; «ЭТА» относится к этаноламину; «GS» относится к глутаминсинтетазе; «НС» относится к тяжелой цепи; «ННС» относится к хроматографии гидрофобного взаимодействия; «ч» относится к часу или часам; «в/в» относится к внутривенному введению; «кДа» относится к килоДальтонам; «LC» относится к легкой цепи; «ЖХ-МС» относится к жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии; «мин» относится к минуте или минутам; «МС» относится к масс-спектрометрии; «MSX» относится к метионинсульфоксиминому; «NHS» относится к N-гидроксисукцинимиду;

«OtBu» относится к О-трет-бутилу; «ПЭИ» относится к полиэтиленмину; «ОФ-ВЭЖХ» относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой; «с» относится к секунде или секундам; «NaOAc» относится к ацетату натрия; «gcf» означает относительную центробежную силу; «КТ» означает комнатную температуру; «RU» означает резонансные единицы; «п/к» относится к подкожному введению; «SEC» относится к эксклюзионной хроматографии; «СОС» относится к стандартной ошибке среднего; «SPR» означает поверхностный плазмонный резонанс; « $t_{1/2}$ » относится к периоду полужизни; «TFA» относится к трифторуксусной кислоте; « T_{max} » относится ко времени до достижения максимальной наблюдаемой концентрации; и «Trt» относится к тритилу.

[45] *Соединения антигенсвязывающего фрагмента против GITR человека*

[46] Согласно настоящему изобретению предложено соединение антигенсвязывающего фрагмента против GITR человека, содержащее: 1) переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2 или 7, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых случаях соединение антигенсвязывающего фрагмента против GITR человека содержит Fab, содержащий каппа-CL человека и CH1 IgG1 человека.

[47] *Соединения, содержащие удлинители периода полужизни на основе VHH*

[48] В общих чертах, некоторые соединения, описанные в настоящем документе, имеют формулу (от N-конца к C-концу): X-L-M, где М представляет собой соединение, действующее как фрагмент, продлевающий $t_{1/2}$, L (если присутствует) представляет собой линкер, и X представляет собой фрагмент Fab антитела, который связывает GITR человека. В некоторых случаях L может иметь аминокислотную последовательность, содержащую (GGGGQ)_n, (GGGQ)_n, (GGGGS)_n, (PGPQ)_n, (PGPA)_n, GGGG(AP)_nGGGG, (GGE)_n, (GGGGE)_n, (GGK)_n, (GGGGK)_n, GGGG(EP)_nGGGG, GGGG(KP)_nGGGG, (PGPE)_n или (PGPK)_n, где n может быть от 1 до 15, в частности, от примерно 5 до примерно 10. В некоторых случаях М представляет собой альбуминсвязывающий VHH, и L представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность (GGGGQ)_n, где n может быть от 1 до 15, в частности, от примерно 4 до примерно 8. В других случаях М содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, и L может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11 или 12. В других

случаях L может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен так, что L имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере от примерно 90% до примерно 99% сходства последовательности с любой из SEQ ID NO: 11 или 12. В других случаях L может представлять собой полимер, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), в частности, (ПЭГ)_n, где n может быть от 1 до 20.

[49] В некоторых случаях соединения, раскрытые в настоящем документе, имеют формулу (от N-конца к C-концу): X-L-M, где M содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, или имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере от примерно 90% до примерно 99% сходства последовательности с указанной последовательностью, где L (если присутствует) представляет собой линкер, и X представляет собой Fab, связывающий GITR человека. В некоторых случаях L может иметь аминокислотную последовательность, содержащую (GGGGQ)_n, где n может быть от 1 до 15, в частности, от примерно 4 до примерно 8. В других случаях L может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11 или 12. В других случаях L может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен так, что L имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере от примерно 90% до примерно 99% сходства последовательности с любой из SEQ ID NO: 11 или 12. В других случаях L может представлять собой полимер, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), в частности, (ПЭГ)_n, где n может быть от 1 до 20. Предпочтительно соединение представляет собой антагонист GITR человека.

[50] *Фармацевтические композиции и наборы*

[51] В некоторых случаях соединения антигенсвязывающего фрагмента против GITR человека, раскрытые в настоящем документе, такие как Fab против GITR человека, слияния Fab против GITR человека или их конъюгаты с альбуминсвязывающими VHH (такие как Антитело I и Антитело II, раскрытые в настоящем документе) могут быть изготовлены в виде фармацевтических композиций, которые можно вводить парентеральными путями (например, внутривенно, внутривенно, внутримышечно, подкожно или чрескожно). Такие фармацевтические композиции и методики их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington, «The Science and Practice of Pharmacy» (D.B. Troy ed., 21st Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). В конкретных случаях композиции вводят п/к или в/в. В качестве альтернативы, однако, композиции могут быть изготовлены в формах для других фармацевтически приемлемых путей, таких как, например, таблетки или другие твердые лекарственные формы для перорального введения; капсулы с замедленным высвобождением; и любые

другие формы, используемые в настоящее время, включая кремы, лосьоны, лекарственные формы для ингаляции и т.п.

[52] Как отмечено выше, и чтобы улучшить их совместимость и эффективность *in vivo*, слияния на основе VNH или конъюгаты на основе VNH, описанные в настоящем документе, могут быть подвергнуты реакции с любым числом неорганических и органических кислот/оснований с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты/основания. Фармацевтически приемлемые соли и обычные методики их получения хорошо известны в данной области техники (См., например, Stahl *et al.*, «Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use» (2nd Revised Ed. Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для применения, описанного в настоящем документе, включают соли натрия, трифторацетатные, гидрохлоридные и ацетатные соли.

[53] Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть введены врачом или могут быть введены самостоятельно с помощью инъекции. Понятно, что номер калибра иглы и величина объема инъекции могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Однако объем инъекции может составлять $\leq$ примерно 2 мл или даже $\leq$ примерно 1 мл, а калибр иглы может составлять $\geq$ примерно 27 G или даже $\geq$ примерно 29 G.

[54] Согласно настоящему изобретению также предложены и, следовательно, охвачены новые промежуточные продукты и способы, которые можно применять для синтеза соединений, описанных в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемых солей. Промежуточные продукты и соединения могут быть получены с помощью различных методик, которые хорошо известны в данной области техники. Например, способ с использованием рекомбинантного синтеза проиллюстрирован в приведенных ниже Примерах. Конкретные этапы для каждой из описанных методик можно по-разному комбинировать для получения соединений. Реагенты и исходные материалы легко доступны специалисту в данной области техники.

[55] Соединения, описанные в настоящем документе, обычно эффективны в широком диапазоне доз. Примерные дозы соединений, описанных в настоящем документе, или фармацевтических композиций, включающих указанные соединения, могут представлять собой количества в миллиграммах (мг) или микрограммах (мкг) на килограмм (кг) массы тела индивидуума. Таким образом, суточная доза может составлять от примерно 1 мкг до примерно 1000 мг.

[56] В данном случае, эффективное количество соединения в фармацевтической композиции может представлять собой дозу от примерно 2,5 мг до примерно 1000 мг.

Однако специалисту в данной области техники понятно, что в некоторых случаях эффективное количество (т.е. доза/дозировка) может быть ниже нижнего предела указанного выше диапазона и может быть более чем достаточным, в то время как в других случаях эффективное количество может представлять собой большие дозы и может применяться с приемлемыми побочными эффектами.

[57] В дополнение к соединению, описанному в настоящем документе, фармацевтическая композиция также может включать по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, такой как, например, терапевтический агент, как правило, используемый в качестве стандарта лечения при конкретном состоянии, заболевании и нарушении (например, сердечно-сосудистом, неврологическом, иммунологическом, метаболическом, онкологическом, психологическом, пульмонологическом и/или почечном состоянии, заболевании или нарушении).

[58] Таким образом, фармацевтическая композиция может включать эффективное количество одного или более соединений, описанных в настоящем документе, фармацевтически приемлемый носитель и необязательно по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

[59] В качестве альтернативы, соединения, описанные в настоящем документе, могут быть предложены как часть набора. В некоторых случаях набор включает устройство для введения индивидууму по меньшей мере одного соединения (и необязательно по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента). В некоторых случаях набор включает шприц и иглу для введения по меньшей мере одного соединения (и необязательно по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента). В конкретных случаях соединение (и необязательно по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент) предварительно готовят в водном растворе внутри шприца.

[60] *Способы получения и применения соединений на основе VNN, продлевающих период полужизни, или их слияний и конъюгатов*

[61] Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть получены с помощью любого числа стандартных способов рекомбинантной ДНК или стандартных способов химического синтеза пептидов, известных в данной области техники. В отношении способов рекомбинантной ДНК можно использовать стандартные рекомбинантные методики для конструирования полинуклеотида, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность соединения (т.е. слитого пептида или слитого белка, или слитого конъюгата), включения этого полинуклеотида в рекомбинантные векторы экспрессии и введения векторов в клетки-хозяева, такие как бактериальные клетки, дрожжевые клетки и

клетки млекопитающих, с получением соединения. (См., например, Green & Sambrook, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th ed. 2012)).

5 [62] В отношении способов рекомбинантной ДНК соединения, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем продуцирования белка или молекулы белка-предшественника с использованием методик рекомбинантной ДНК. ДНК, включая кДНК и синтетическую ДНК, может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и ее кодирующие последовательности, которые кодируют соединение, описанное в настоящем документе, могут различаться в результате избыточности или вырожденности генетического

10 кода. Вкратце, последовательности ДНК, кодирующие соединения, описанные в настоящем документе, вводят в клетку-хозяина для получения соединения или его предшественника. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, такие как штаммы K12 или B *Escherichia coli*, грибковые клетки, такие как дрожжевые клетки, или клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (СНО).

15 [63] Подходящую клетку-хозяина временно или стабильно трансфицируют или трансформируют системой экспрессии, такой как векторы экспрессии, для получения соединения, описанного в настоящем документе, или его предшественника. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии

20 будут содержать маркеры селекции, например, на тетрациклин, неомицин, G418 и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить возможность отбора тех клеток, которые трансформированы желаемыми последовательностями ДНК.

[64] Могут быть использованы, не использованы или комбинированы в различных сочетаниях конкретные этапы биосинтеза или синтеза для каждого из этапов, описанных в

25 настоящем документе, для получения соединений, описанных в настоящем документе.

[65] В отношении способов химического синтеза пептидов можно использовать стандартные процедуры твердофазного синтеза в ручном или автоматизированном режиме. Например, автоматизированные синтезаторы пептидов коммерчески доступны от, например, Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния) и Protein Technologies Inc.

30 Тусон, Аризона). Реагенты для твердофазного синтеза легко доступны из коммерческих источников. Твердофазные синтезаторы можно использовать в соответствии с инструкциями производителя для блокирования мешающих групп, защиты аминокислот во время реакции, связывания, снятия защиты и экпирования непрореагировавших аминокислот.

[66] Способы могут включать этапы, описанные в настоящем документе, и они могут, но не обязательно, выполняться в описанной последовательности. Однако возможны и другие последовательности выполнения. Более того, отдельно взятые или многочисленные этапы могут выполняться либо параллельно и/или с перекрытием во времени, и/или независимо или в многократно повторяемых этапах. Кроме того, способы могут включать дополнительные неуказанные этапы.

[67] Таким образом, такие способы могут включать выбор индивидуума, имеющего аутоиммунное состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему.

[68] Способы также могут включать введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного соединения, описанного в настоящем документе, которое может быть в форме фармацевтической композиции, как также описано в настоящем документе. В некоторых случаях соединение/фармацевтическая композиция может включать дополнительный терапевтический агент.

[69] Концентрация/доза/дозировка соединения и необязательного дополнительного терапевтического агента обсуждаются в другом месте настоящего документа.

[70] В отношении пути введения соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, можно вводить известными способами, такими как, например, перорально; с помощью инъекции (т.е. внутриаартериально, внутривенно, внутрибрюшинно, интрацеребрально, интрацеребровентрикулярно, внутримышечно, интраокулярно, внутримышечно или внутримышечно); с помощью систем замедленного высвобождения или имплантируемых устройств. В некоторых случаях соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, можно вводить п/к путем болюсной инъекции или непрерывно.

[71] В отношении частоты дозирования соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (т.е. еженедельно), раз в две недели (т.е. каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, вводят п/к через день, п/к три раза в неделю, п/к два раза в неделю, п/к один раз в неделю, п/к каждые две недели или п/к ежемесячно. В конкретных случаях соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, вводят п/к один раз в неделю (1 раз/нед.).

[72] В качестве альтернативы, и при внутривенном введении, соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, вводят в/в через день, в/в три раза в неделю, в/в два раза в неделю, в/в один раз в неделю, в/в каждые две

недели или в/в ежемесячно. В конкретных случаях соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, вводят в/в один раз в неделю (в/в 1 раз/нед.).

[73] Что касается тех случаев, когда соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение, вводят в комбинации с эффективным количеством по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с соединением или фармацевтической композицией, включающей указанное соединение.

[74] Более того, дополнительный терапевтический агент можно вводить с такой же частотой, что и соединение или фармацевтическую композицию, включающую указанное соединение (т. е. через день, два раза в неделю или даже еженедельно). В качестве альтернативы, дополнительный терапевтический агент можно вводить с частотой, отличной от частоты введения соединения или фармацевтической композиции, включающей указанное соединение. В других случаях дополнительный терапевтический агент может быть введен п/к. В других случаях дополнительный терапевтический агент может быть введен в/в. В других случаях дополнительный терапевтический агент может быть введен перорально.

[75] Также предусмотрено, что способы можно комбинировать с дополнительными терапевтическими агентами, отличными от тех, которые обсуждались выше.

ПРИМЕРЫ

[76] Нижеследующие неограничивающие примеры предложены в целях иллюстрации, а не ограничения.

[77] ЭКСПРЕССИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ

[78] Пример 1: Рекомбинантная экспрессия Антитела I

[79] Антитело I представляет собой слияние Fab против GITR человека и альбуминсвязывающего VHH, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGTH
EYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREN NWAPDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGGQGGG
GQGGGGGQGGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQA
PGKGRFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAR

PGRPLITSKVADLYPYWGQGLVTVSSPP (SEQ ID NO:14); и аминокислотную последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNSLAWYQQKPGKAPKRLIYA AFSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCYQYYNYP SAFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSD
5 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:16).

[80] Антитело с тяжелой цепью, имеющей SEQ ID NO:14, и легкой цепью, имеющей SEQ ID NO:16, создают в системе экспрессии в клетках млекопитающих с использованием производных клеток CHOK1 (Lonza Biologics Inc.). Последовательности
10 кДНК, кодирующие SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:16, субклонируют в каркасы GS-содержащих экспрессионных плазмид (плазмиды на основе pEE12.4; Lonza Biologics Inc.). Последовательность кДНК сливают в рамке считывания с кодирующей последовательностью сигнального пептида, METDTLLLWVLLWVPGSTG (SEQ ID NO:22), для усиления секреции антитела в среду тканевой культуры. Экспрессия
15 управляется вирусным промотором ЦМВ.

[81] Для создания антитела посредством временной трансфекции клетки CHOK1 трансфицируют рекомбинантными экспрессионными плазмидами в равном стехиометрическом соотношении с использованием метода, основанного на ПЭИ. В
общих чертах, соответствующий объем суспензии клеток CHOK1 при плотности
20 4×10^6 клеток/мл переносят во встряхиваемые колбы, и к клеткам добавляют ПЭИ и рекомбинантную плазмидную ДНК. Клетки инкубируют в суспензионной культуре при 32°C в течение 6 дней. В конце периода инкубации клетки удаляют центрифугированием на низкой скорости, и антитело очищают из кондиционированной среды.

[82] В качестве альтернативы и для создания антитела посредством стабильных
25 трансфекций клетки CHOK1 стабильно трансфицируют с использованием электропорации и соответствующего количества рекомбинантной экспрессионной плазмиды, и трансфицированные клетки поддерживают в суспензионной культуре при подходящей плотности клеток. Отбор трансфицированных клеток осуществляют путем выращивания в бессывороточной среде, содержащей 25 мкМ MSX, и инкубируют при примерно 35°C-
30 37°C и примерно 5%-7% CO₂. Затем клетки удаляют центрифугированием на низкой скорости, и антитело очищают из кондиционированной среды.

[83] Антитело секретируется в среду из клеток CHO, и его очищают с помощью аффинной хроматографии с белком А с последующей катионообменной хроматографией. В частности, антитело из собранной среды захватывают на смоле MabSelect PrismA Protein
35 А (Cytiva). Затем смолу быстро промывают промывочным буфером, таким как фосфатно-

солевой буфер (ФСБ; pH 7,4), или буфером, содержащим Трис, для удаления неспецифично связанного материала. Белок элюируют из смолы раствором с низким pH, таким как 10 mM лимонная кислота, pH 3. Фракции, содержащие антитело, объединяют и могут поддерживать при низком pH для инактивации потенциальных вирусов. pH может
5 быть нейтрализован добавлением основания, такого как 0,1 M Трис, pH 8,0. Антитело может быть дополнительно очищено с помощью ионообменной хроматографии с использованием смол, таких как POROS 50 HS (ThermoFisher). Антитело может быть элюировано из колонки с использованием градиента от 0 до 1 M NaCl в 20 mM ацетате натрия, pH 5,0, при 20 объемах колонки.

10 [84] Буфер в очищенном антителе может быть заменен фосфатно-солевым буфером или, альтернативно, указанное антитело может быть пропущено через удерживающий вирусы фильтр, такой как Planova 20N (Asahi Kasei Medical), с последующим концентрированием/диафильтрацией в фосфатно-солевой буфер с использованием ультрафильтрации с тангенциальным потоком на регенерированной целлюлозной
15 мембране (Millipore).

[85] Таким образом, антитело получают с помощью данного способа или подобного способа, что может быть легко определено специалистом в данной области техники.

20

25

30

35

40

[86] Таблица 1: SEQ ID NO для Антитела I

Антитело I	
Аминокислотная последовательность для:	SEQ ID NO:
HCDR1	1
HCDR2	2
HCDR3	3
LCDR1	4
LCDR2	5
LCDR3	6
HCVR	8
LCVR	10
Линкер	11
альбуминсвязывающий VHH	13
Слияние HC Fab против GITR–VHH	14
LC	16
Последовательность ДНК для:	SEQ ID NO:
Слияние HC Fab против GITR–VHH	17
LC	19

[87] Пример 2: Рекомбинантная экспрессия Антитела II

[88] Антитело II представляет собой слияние Fab против GITR человека и альбуминсвязывающего VHH, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGTH
 ELYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREN NWAPDYWGQGTLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL
 10 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGQGGG
 GQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQA
 PGKGREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAR
 PGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:15)

и аминокислотную последовательность легкой цепи:

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNSLAWYQQKPGKAPKRLIYA AFSLQSGVPS
 RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCYQYYNYP SAFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD

EQLKSGTASVVCLLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:16).

[89] Антитело с тяжелой цепью, имеющей SEQ ID NO:15, и легкой цепью, имеющей SEQ ID NO:16, создают по существу так же, как описано для Примера 1, за исключением того, что последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO:15 и 16, используют в экспрессионных плазмидах.

[90] Таблица 2: SEQ ID NO для Антитела II

Антитело II	
Аминокислотная последовательность для:	SEQ ID NO:
HCDR1	1
HCDR2	7
HCDR3	3
LCDR1	4
LCDR2	5
LCDR3	6
HCVR	9
LCVR	10
Линкер	11
альбуминсвязывающий VHH	13
Слияние HC Fab против GITR-VHH	15
LC	16
Последовательность ДНК для:	SEQ ID NO:
Слияние HC Fab против GITR-VHH	18
LC	19

[91] Пример 3: Связывание антител с ортологами альбумина согласно SPR

[92] Связывание *in vitro* антител (т. е. слияний Fab против GITR человека и альбуминсвязывающего VHH) с сывороточным альбумином человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика определяют с помощью SPR при 25°C. В частности, аффинность Антител I и II в отношении сывороточного альбумина этих видов представлена в обобщенном виде ниже в Таблицах 3 и 4, соответственно.

[93] Связывание Антитела I и Антитела II с различными сывороточными альбуминами проводят на приборе Biacore 8K. Иммуобилизацию сывороточного альбумина на поверхности сенсорного чипа CM5 серии S (Cytiva 29149603) выполняют в

соответствии с инструкциями производителя (набор для связывания по аминок группам BR-1000-50). В общих чертах, карбоксильные группы на поверхности сенсорного чипа (проточная кювета 1 и 2) активируют путем впрыскивания 70 мкл смеси, содержащей 75 мг/мл гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и 11,5 мг/мл N-гидроксисукцинимид (NHS), при 10 мкл/мин. Сывороточный альбумин человека, яванской макаки, крысы, мыши, собаки, свиньи, коровы и кролика разводят в 10 mM ацетате натрия, pH 4,0 (BR-1003-49), при 0,8, 0,8, 0,8, 2,5, 0,8, 1, 1 и 1,5 мкг/мл, а затем впрыскивают над активированными поверхностями чипа (проточная кювета 2, канал 1–8) при 10 мкл/мин в течение 100 секунд. Сывороточный альбумин человека получали от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури) (кат. № A8763). Сывороточный альбумин яванской макаки получали от Athens R&T (Афины, Джорджия) (кат. № 16-16-011202-CM). Сывороточный альбумин крысы получали от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури) (кат. № A4538). Сывороточный альбумин мыши получали от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури) (кат. № A3139). Сывороточный альбумин собаки получали от Molecular Innovations (Нови, Мичиган) (кат. № DSA-1213 NC0739153). Сывороточный альбумин свиньи получали от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури) (кат. № A4414). Сывороточный альбумин коровы получали от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури) (кат. № A7030). Сывороточный альбумин кролика получали от Fitzgerald Industries International (Актон, Массачусетс) (кат. № 30R-3303).

[94] Сывороточные альбумины ковалентно иммобилизуют посредством свободных аминов на покрытом карбоксиметилдекстраном сенсорном чипе CM5 при поверхностной плотности 29–52 резонансные единицы (RU) для сывороточного альбумина человека, яванской макаки, крысы, мыши, собаки, свиньи и коровы, а также 118 резонансных единиц (RU) для сывороточного альбумина кролика. Избыточные реактивные группы на поверхностях (проточная кювета 1 и 2) дезактивируют путем впрыскивания 70 мкл 1 M гидрохлорида этаноламина-NaOH, pH 8,5.

[95] Антитела из Примеров 1 и 2 (т.е. Антитела I и II, соответственно) разводят в буфере HBS-EP+ (10 mM HEPES, pH 7,6, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% полисорбата 20) в концентрациях 1000, 333,3, 111,1, 37,04, 12,35, 4,12, 1,37, 0,457, 0,152, 0,051 и 0,017 нМ. 180 мкл образца индивидуально впрыскивают последовательно к разным иммобилизованным сывороточным альбуминам на поверхности чипа и диссоциируют в течение 600 секунд при скорости потока 60 мкл/мин при 25°C. Поверхность регенерируют путем впрыскивания 10 mM глицина-HCl, pH 1,5 (BR-1003-54), при 60 мкл/мин в течение 100 с. Полученные сенсограммы анализируют с использованием программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation (версия 3.0.11.15423) и аппроксимируют с

использованием модели кинетики связывания 1:1, чтобы рассчитать параметры кинетики связывания: константу скорости ассоциации (k_a), константу скорости диссоциации (k_d) и равновесную константу диссоциации (K_D). K_D определяют как 0,25, 4,4, 53, 44, 100, 20 и 460 нМ для связывания сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с Антителом I (Таблица 3). K_D определяют как 0,4, 5,9, 42, 51, 99, 20 и 430 нМ для связывания сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с Антителом II (Таблица 4).

[96] Таблица 3: Кинетика связывания Антитела I с сывороточным альбумином человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25°C.

Связывание с иммобилизованными сывороточными альбуминами (СА)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)
СА человека	$2,6 \times 10^5$	$6,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-10}$
СА яванской макаки	$1,9 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-9}$
СА мыши	$1,8 \times 10^5$	$9,4 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-8}$
СА крысы	$1,6 \times 10^5$	$7,0 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-8}$
СА свиньи	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-7}$
СА собаки	$1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-8}$
СА коровы	$2,0 \times 10^5$	$9,1 \times 10^{-2}$	$4,6 \times 10^{-7}$
СА кролика	Связывание отсутствует		

[97] Таблица 4: Кинетика связывания Антитела II с сывороточным альбумином человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25°C.

Связывание с иммобилизованными сывороточными альбуминами (СА)	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)
СА человека	$1,9 \times 10^5$	$7,8 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-10}$
СА яванской макаки	$1,5 \times 10^5$	$8,7 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-9}$
СА мыши	$2,3 \times 10^5$	$9,6 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-8}$
СА крысы	$1,4 \times 10^5$	$7,3 \times 10^{-3}$	$5,1 \times 10^{-8}$
СА свиньи	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-2}$	$9,9 \times 10^{-8}$
СА собаки	$1,7 \times 10^5$	$3,4 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-8}$
СА коровы	$2,0 \times 10^5$	$8,7 \times 10^{-2}$	$4,3 \times 10^{-7}$
СА кролика	Связывание отсутствует		

[98] Пример 4: Связывание антитела с клетками, экспрессирующими GITR

[99] Клетки Jurkat, экспрессирующие GITR человека/NFkB-Luc2 (CS184004), приобрели у Promega и поддерживали в среде RPMI1640 + 10% ФБС (HyClone SH30070.3) + 400 мкг/мл гигромицина В + 600 мкг/мл G418.

[100] Репортер NFkB, pNiFty2-Luc (InvivoGen), вводят в клетки Jurkat (ATCC) с помощью электропорации, и трансфектантов отбирают с использованием 400 мкг/мл зеодина в течение 2 недель. Полученную клеточную линию Jurkat NFkB-luc трансдуцируют лентивирусом, несущим GITR яванских макаков, и отбирают с использованием 0,5 мкг/мл пурамицина в течение 1 недели. Клетки Jurkat, экспрессирующие GITR яванской макаки/NFkB-luc, поддерживают в среде RPMI1640 + 10% ФБС (HyClone SH30070.3) + 400 мкг/мл зеодина + 0,5 мкг/мл пурамицина.

[101] Клетки Jurkat, экспрессирующие GITR человека/NFkB-Luc2, и Jurkat, экспрессирующие GITR яванской макаки/NFkB-luc, ресуспендируют в буфере для FACS (ФСБ + 1% БСА + 0,01% азида натрия) при 1 млн клеток/мл, добавляют 5 мкл блокатора Fc/мл (BioLegend) и инкубируют при 4°C в течение 20 мин. Клетки промывают буфером для FACS, ресуспендируют при 1×10^6 клеток/мл в буфере для FACS и добавляют в полипропиленовый 96-луночный планшет при 100 мкл/лунку для получения плотности 100000 клеток/лунку. К клеткам добавляют 100 мкл/лунку 2X титрований дозы антитела, разведенных в буфере для FACS, и инкубируют в течение 45 минут при 4°C. Клетки дважды промывают 200 мкл/лунку буфера для FACS и ресуспендируют в 12,5 мкг/мл ФЭ-конъюгированного вторичного антитела против легкой каппа-цепи Ig человека (Invitrogen, № по каталогу PA1-74408) в буфере для FACS и инкубируют 45 минут при 4°C. Клетки дважды промывают 200 мкл/лунку буфера для FACS и ресуспендируют в 200 мкл буфера для FACS. Образцы считывают на цитометре Millipore EasyCyte и рассчитывают медианные значения интенсивности флуоресценции с использованием программного обеспечения GuavaSoft 3.3 InCyte. Значения EC₅₀ рассчитывают для каждого из 3 повторов эксперимента, и среднее геометрическое EC₅₀ +/-ошибка (дельта-метод) рассчитывают на основании этих 3 результатов. Результаты по связыванию клеток, показанные в Таблице 5, указывают, что как Антитело I, так и Антитело II сильно связываются с GITR человека и GITR яванской макаки («GITR яванской макаки»). С другой стороны, адалимумаб Fab-albVHH, использованный в качестве отрицательного контроля в этом исследовании, продемонстрировал незначительное связывание с GITR человека и GITR яванской макаки (данные не показаны).

[102] Таблица 5: Активность *in vitro* связывания антител с линиями клеток Jurkat GITR.

Соединение	Геом. среднее EC ₅₀ связывания с клетками, экспрессирующими GITR человека (нМ)	Ошибка (дельта- метод)	N	Геом. среднее EC ₅₀ связывания с клетками, экспрессирующими GITR яванской макаки (нМ)	Ошибка (дельта- метод)	N
Антитело I	6,80	0,30	3	3,06	0,04	3
Антитело II	3,25	0,12	3	2,34	0,06	3

[103] Пример 5: Антагонизм GITRL с помощью антитела *in vitro* на GITR человека и яванской макаки

[104] Клетки Jurkat, экспрессирующие GITR человека/NFkB-Luc2, или Jurkat, экспрессирующие GITR яванской макаки/NFkB-Luc, поддерживают в истощающих условиях в течение ночи в среде для анализа (RPMI1640 + 1% ФБС) при 37°C, 5% CO₂ и ресуспендируют на следующий день в среде для анализа (RPMI1640 + 1% ФБС) при 2×10⁶ клеток/мл. 25 мкл/лунку клеточной суспензии добавляют в белые непрозрачные 96-луночные планшеты (Corning Costar) при 5×10⁵ клеток/лунку. Добавляют 50 мкл/лунку 2X титрований дозы антитела, разведенных в среде для анализа, и немедленно добавляют 25 мкл/лунку 4X (12 нМ) GITRL человека или GITRL яванской макаки, соответственно, разведенных в среде для анализа. Планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 часов и затем помещают при комнатной температуре на 15 минут. 100 мкл/лунку реагента для люциферазы BioGlo (Promega) добавляют на лунку и инкубируют при встряхивании в течение 5 минут при комнатной температуре. Люминесценцию измеряют с помощью считывающего устройства для планшетов BioTek SynergyNeo2 с программным обеспечением Gen5. Значения IC₅₀ рассчитывают для ингибирования GITRL с помощью обработок антагонистическим антителом против GITR для каждого из 3 повторов эксперимента, и среднее геометрическое значение IC₅₀ с ошибкой (дельта-метод) рассчитывают на основании этих 3 результатов.

[105] Таблица 6: Активность *in vitro* антагонистических антител против GITR в отношении ингибирования стимуляции GITRL клеток Jurkat, экспрессирующих GITR/NFkB и люциферазу.

Соединение	Геом. среднее IC ₅₀ для GITR человека (нМ)	Ошибка (дельта-метод)	N	Геом. среднее IC ₅₀ для GITR яванской макаки (нМ)	Ошибка (дельта-метод)	N
Антитело I	4,10	0,98	3	2,27	0,37	3
Антитело II	1,68	0,18	3	1,26	0,09	3

[106] Результаты функционального биологического анализа на основе репортера люциферазы в Таблице 6 демонстрируют, что как Антитело I, так и Антитело II сильно ингибируют стимуляцию GITRL человека GITR человека и стимуляцию GITRL яванской макаки GITR яванской макаки.

[107] Пример 6: Агонистическое действие антитела *in vitro* на GITR человека и яванской макаки

[108] Клетки Jurkat, экспрессирующие GITR человека/NFkB-Luc2, или Jurkat, экспрессирующие GITR яванской макаки/NFkBLuc, поддерживают в истощающих условиях в течение ночи в среде для анализа (RPMI1640 + 1% ФБС) при 37°C, 5% CO₂ и ресуспендируют на следующий день в среде для анализа (RPMI1640 + 1% ФБС) при 2×10⁶ клеток/мл. 50 мкл/лунку клеточной суспензии добавляют в белые непрозрачные 96-луночные планшеты (Corning Costar) при 5×10⁵ клеток/лунку. Добавляют 50 мкл/лунку 2X титрований дозы антитела, разведенных в среде для анализа, и планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 часов, а затем помещают на 15 минут при комнатной температуре. 100 мкл/лунку реагента для люциферазы BioGlo (Promega) добавляют на лунку и инкубируют при встряхивании в течение 5 минут при комнатной температуре. Люминесценцию измеряют с помощью считывающего устройства для планшетов BioTek SynergyNeo2 с программным обеспечением Gen5. Значения EC₅₀ рассчитывают для обработок антителами против GITR для каждого из 2 или 3 повторов эксперимента, и геометрическую ошибку EC₅₀ (дельта-метод) рассчитывают по этим результатам.

[109] Таблица 7: Агонистическое действие антител против GITR *in vitro* на клетки Jurkat, экспрессирующие GITR/NFkB и люциферазу.

Соединение	Геом. среднее EC ₅₀ для GITR человека (нМ)	N	Геом. среднее IC ₅₀ для GITR яванской макаки (нМ)	N
Антитело I	нет активности	3	нет активности	3
Антитело II	нет активности	3	нет активности	3
Антитело III	8,50	2	0,52	2

[110] Результаты функционального биологического анализа на основе репортера люциферазы в Таблице 7 демонстрируют, что обработка клеток Jurkat, экспрессирующих GITR человека/NFkB и люциферазу, или Jurkat, экспрессирующих GITR яванской макаки/NFkB и люциферазу, Антителом I или Антителом II в отсутствие GITRL не приводила к агонистической стимуляции. Напротив, обработка двухвалентным вариантом IgG Антитела I (т.е. Антителом III) действительно индуцировала активацию пути GITR.

[111] Пример 7: Антагонистическое действие антитела *in vitro* на костимуляцию GITRL пролиферации Т-клеток.

[112] Одним из аспектов биологии GITRL является его способность костимулировать Т-клетки, что приводит к усилению пролиферации. В этом примере продемонстрировано, что обработка Антителом I и Антителом II сильно ингибирует костимуляцию GITRL, связанным с планшетом, пролиферации Т-клеток человека. CD3⁺ Т-клетки человека выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) и стимулировали при $1,5 \times 10^6$ клеток/мл с использованием 0,2 мкг/мл антитела против CD3, связанного с планшетом, в течение 4 дней для увеличения экспрессии GITR на Т-клетках. Затем Т-клеткам давали отдохнуть в культуральной среде в течение 2 дней для подготовки клеток к повторной стимуляции. Затем Т-клетки после активации и периода покоя при $1,5 \times 10^6$ клеток/мл костимулировали 2 мкг/мл антитела против CD3, связанного с планшетом, и 1 нМ GITRL человека в течение 5 дней в присутствии титрований дозы Антитела I или Антитела II. Пролиферацию Т-клеток измеряли по поглощению H³-тимидина в течение последних 18 часов инкубации. Каждое антитело тестировали в условиях трехкратного титрования дозы и тестировали на четырех разных донорах в трех отдельных экспериментах.

[113] Таблица 8: Активность *in vitro* антагонистических антител против GITR в отношении ингибирования костимуляции GITRL пролиферации Т-клеток.

Соединение	Геом. среднее IC ₅₀ для GITR человека (нМ)	Ошибка (дельта- метод)	N
Антитело I	4,76	1,42	4
Антитело II	1,84	0,52	4

[114] Результаты анализа костимуляции GITRL, показанные в Таблице 8, демонстрируют, что Антитело I и Антитело II сильно ингибируют костимуляцию GITRL пролиферации Т-клеток. Напротив, фрагмент антитела albVHH, использованный в качестве отрицательного контроля, продемонстрировал незначительную способность ингибировать костимуляцию GITRL пролиферации Т-клеток (данные не показаны).

[115] Пример 8: Восстановление антителами *in vitro* подавления регуляторными Т-клетками пролиферации эффекторных Т-клеток в присутствии GITRL.

Одним из аспектов биологии GITRL является его способность ингибировать подавление регуляторными Т-клетками пролиферации эффекторных Т-клеток посредством связывания и активации GITR. В этом примере мы демонстрируем, что обработка Антителом I и Антителом II эффективно восстанавливает подавляющую активность регуляторных Т-клеток в присутствии GITRL, связанного с планшетом. Т-клетки человека и CD4⁺CD127^{low}CD25⁺ регуляторные Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) и метили с помощью CellTrace CFSE или CellTrace Violet (Invitrogen), соответственно. Т-клетки и CD4⁺CD127^{low}CD25⁺ регуляторные Т-клетки объединяли в соотношении 2:1 в присутствии титрований дозы Антитела I или Антитела II и стимулировали 2 мкг/мл антитела против CD28 и 1 мкг/мл антитела против CD3, связанного с планшетом, и 2 нМ GITRL. После инкубации в течение четырех дней пролиферацию CD4⁺ Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии, отслеживая метку CFSE, за исключением меченных CellTrace Violet CD4⁺CD127^{low}CD25⁺ регуляторных Т-клеток. Анализ выполняли с четырьмя отдельными донорами в четырех отдельных случаях. Зарегистрировали 10000 событий на обработку (один биологический повтор на протестированную концентрацию антитела) и использовали для расчета процента пролиферации эффекторных Т-клеток.

[116] Таблица 9: Активность *in vitro* антагонистических антител против GITR в отношении восстановления подавления регуляторными Т-клетками пролиферации эффекторных Т-клеток в присутствии GITRL

Соединение	Среднее IC ₅₀ для GITR человека (нМ)	Ошибка (дельта-метод)	N
Антитело I	4,69	0,20	4
Антитело II	2,72	0,83	4

[117] Результаты анализа, представленные в Таблице 9, демонстрируют, что Антитело I и Антитело II сильно восстанавливают подавление регуляторными Т-клетками пролиферации эффекторных Т-клеток в присутствии GITRL.

5

[118] Пример 9: Фармакокинетика антител у мышей

[119] Самцам мышей C57BL/6 вводят однократную в/в или п/к дозу 10 мг/кг Антитела I или Антитела II в ФСБ (рН 7,4) в объеме 0,1 мл/животное. Для фармакокинетической характеристики кровь собирают у 3 животных/группу/момент времени через 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240 и 336 часов после в/в введения дозы или через 3, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 168, 240 и 336 часов после п/к введения дозы и обрабатывают с получением плазмы.

10

15

20

[120] Концентрации Антител I и II в плазме определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА) с захватом антигена GITR на планшете. Рекомбинантную химеру GITR человека-Fc (rh GITR/TNFRSF18 Fc) наносят в виде покрытия на планшеты для ИФА в качестве реагента для захвата при 1 мг/мл. После инкубации со стандартами плазмы, контролем и образцами для детектирования Антитела I или Антитела II, связанного с планшетом, используют конъюгированное с пероксидазой хрена козье антитело против Fab Ig человека. Фармакокинетические параметры рассчитывают с использованием некомпартментного анализа (NCA) средних концентраций, определенных в каждый момент времени (N=1-3 животных/группу/момент времени). NCA выполняют с использованием Watson Bioanalytical LIMS. Как показано в Таблице 10, Антитела I и II демонстрируют удлинённый фармакокинетический профиль у мышей C57BL/6.

25

30

[121] Таблица 10: Комплексные фармакокинетические параметры в плазме для Антител I и II после введения однократной дозы 10 мг/кг в/в или п/к самцам мышей C57BL/5.

Антитело	Путь	C ₀ (мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (ч)	AUC _{0-inf} (ч*мкг/мл)	CL или CL/F (мл/ч/кг)	t _{1/2} (ч)	%F
I	в/в	86,8	Нет данных	Нет данных	5630	1,78	50,6	Нет данных
I	п/к	Нет данных	42,4	12	3270	3,06	40,7	58,1
II	в/в	124	Нет данных	Нет данных	5430	1,84	29,3	Нет данных
II	п/к	Нет данных	69,2	12	3500	2,86	34,6	64,5

5 [122] Пример 10: Фармакокинетика антител у крыс

[123] Самцам крыс Sprague Dawley вводят однократную в/в или п/к дозу 10 мг/кг Антитела I или Антитела II в ФСБ (рН 7,4) в объемах 2,5 мл/кг и 1 мл/кг, соответственно. Для фармакокинетической характеристики кровь собирают у 3 животных/группу/момент времени через 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 336, 432 и 504 часа после в/в введения дозы или через 3, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 168, 240, 336, 432 и 504 часа после п/к введения дозы и обрабатывают с получением плазмы.

[124] Концентрации Антител I и II в плазме определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА) с захватом антигена GITR на планшете. Рекombинантную химеру GITR человека-Fc (rh GITR/TNFRSF18 Fc) наносили в виде покрытия на планшет для ИФА в качестве реагента для захвата при 1 мкг/мл. После инкубации со стандартами плазмы, контролем и образцами для детектирования Антитела I или Антитела II, связанного с планшетом, используют конъюгированное с пероксидазой хрена козье антитело к Fab Ig человека (разведенное 1:10000). Фармакокинетические параметры рассчитывают с использованием NCA для каждого животного (N=2-3), и параметры сводят по среднему значению и стандартному отклонению (CO), где это уместно. Фармакокинетические данные были доступны для N=2 крыс, которым подкожно вводили Антитело II, и поэтому сообщаются средние параметры. NCA и сводные статистические расчеты выполняют с использованием Watson Bioanalytical LIMS. Как показано в Таблице 11 и Таблице 12, Антитела I и II продемонстрировали удлиненный фармакокинетический профиль у крыс Sprague Dawley.

[125] Таблица 11: Фармакокинетические параметры в плазме для Антитела I после введения однократной дозы 10 мг/кг в/в (N=3) или 10 мг/кг п/к (N=3) самцам крыс Sprague Dawley.

Антитело	Путь	C ₀ (мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (ч)	AUC _{0-inf} (ч*мкг/мл)	CL или CL/F (мл/ч/кг)	t _{1/2} (ч)	%F
I	в/в	289 (24,3)	Нет данных	Нет данных	14600 (1710)	0,69 (0,08)	54,0 (1,36)	Нет данных
I	п/к	Нет данных	48,8 (6,87)	48 (0)	6630 (267)	1,51 (0,06)	55,4 (1,99)	45,4

ПРИМЕЧАНИЕ: Параметры представлены как среднее значение (СО).

5 [126] Таблица 12: Фармакокинетические параметры в плазме для Антитела II после введения однократной дозы 10 мг/кг в/в (N=3) или 10 мг/кг п/к (N=2) самцам крыс Sprague Dawley.

Антитело	Путь	C ₀ (мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (ч)	AUC _{0-inf} (ч*мкг/мл)	CL или CL/F (мл/ч/кг)	t _{1/2} (ч)	%F
II	в/в	188 (19,4)	Нет данных	Нет данных	10900 (473)	0,92 (0,04)	53,0 (6,90)	Нет данных
II	п/к	Нет данных	24,2	48	3540	2,86	55,6	32,5

ПРИМЕЧАНИЕ: Параметры приведены как среднее значение (п/к путь) или среднее значение (в/в путь).

10

[127] Пример 11: Фармакокинетика антител у яванской макаки

[128] Яванским макакам вводят однократную дозу 0,1, 1 или 10 мг/кг в/в или дозу 10 мг/кг п/к Антитела I или Антитела II в ФСБ (рН 7,2) в объемах 1 мл/кг (в/в) или 0,2 мл/мл (п/к). Для фармакокинетической характеристики кровь собирают у 15 3 животных/группу/момент времени через 0,5, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 432, 504 и 672 часа после введения дозы и обрабатывают с получением плазмы.

[129] Концентрации Антител I и II в плазме определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА) с захватом антигена GITR на планшете. Рекомбинантную химеру GITR человека-Fc (rh GITR/TNFRSF18 Fc) наносят в виде покрытия на планшеты для ИФА в 20 качестве реагента для захвата при 1 мкг/мл. После инкубации со стандартами плазмы, контролем и образцами для определения стабильности антител используют детектирующие антитела. В одном способе конъюгированное с пероксидазой хрена козье

антитело к Fab Ig человека используется для детектирования части Fab связанного с планшетом Антитела I или Антитела II. Во втором способе, биотин-SP AffiniPure козье антитело к IgG альпаки, домен VHH добавляют в качестве вторичного антитела для детектирования метаболически стабильного антитела с интактным линкером Антитела I или Антитела II, связанного с планшетом. После этой инкубации добавляют стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, в качестве реагента для детектирования Антитела I или Антитела II, связанного с планшетом. Фармакокинетические параметры рассчитывают с использованием NCA для каждого животного, и параметры сводят по среднему значению и стандартному отклонению (CO), где это уместно. NCA и сводные статистические расчеты выполняют с использованием Watson Bioanalytical LIMS. Как показано в Таблице 13 и Таблице 14, Антитела I и II демонстрируют удлинённый фармакокинетический профиль у яванских макаков. При сравнении концентраций Антител I или II, измеренных с помощью обоих способов ИФА, наблюдали сходное воздействие и фармакокинетику, что указывает на метаболическую стабильность этих антител *in vivo* после в/в или п/к введения.

[130] Таблица 13: Фармакокинетические параметры в плазме для Антитела I после введения однократной дозы 0,1 (N=1), 1 (N=2) или 10 мг/кг в/в (N=2) или 10 мг/кг п/к (N=2) яванским макакам.

Способ ИФА	Путь	Доза (мг/кг)	C ₀ (мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (ч)	AUC _{0-inf} (ч*мкг/мл)	CL или CL/F (мл/ч/кг)	t _{1/2} (ч)	%F
Детектирование Fab	в/в	0,1	2,25	Нет данных	Нет данных	250	0,40	78,8	Нет данных
	в/в	1	42,2	Нет данных	Нет данных	6090	0,17	236	Нет данных
	в/в	10	386	Нет данных	Нет данных	47100	0,21	247	Нет данных
	п/к	10	Нет данных	106	72	33900	0,30	254	72
Детектирование VНН	в/в	0,1	2,93	Нет данных	Нет данных	286	0,35	96,2	Нет данных
	в/в	1	35,1	Нет данных	Нет данных	4870	0,21	180	Нет данных
	в/в	10	282	Нет данных	Нет данных	41500	0,24	186	Нет данных
	п/к	10	Нет данных	117	48	34300	0,30	209	83

ПРИМЕЧАНИЕ: Параметры представлены как среднее значение.

5

10

15

20

[131] Таблица 14: Фармакокинетические параметры в плазме для Антитела II после введения однократной дозы 0,1 (N=2), 1 (N=2) или 10 мг/кг в/в (N=2) или 10 мг/кг п/к (N=3) яванским макакам.

Способ ИФА	Путь	Доза (мг/кг)	C ₀ (мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (ч)	AUC _{0-inf} (ч*мкг/мл)	CL или CL/F (мл/ч/кг)	t _{1/2} (ч)	%F
Детектирование Fab	в/в	0,1	2,47	Нет данных	Нет данных	189	0,54	82,9	Нет данных
	в/в	1	25,9	Нет данных	Нет данных	3280	0,32	194	Нет данных
	в/в	10	263	Нет данных	Нет данных	46500	0,22	291	Нет данных
	п/к	10	Нет данных	95,9 (12,7)	112 (111)	35600 (1760)	0,28 (0,01)	220 (64,3)	76,6
Детектирование VНН	в/в	0,1	2,28	Нет данных	Нет данных	190	0,53	77,4	Нет данных
	в/в	1	27,6	Нет данных	Нет данных	3620	0,29	224	Нет данных
	в/в	10	349	Нет данных	Нет данных	38100	0,26	218	Нет данных
	п/к	10	Нет данных	99,9 (16,8)	64 (14)	34300 (5460)	0,30 (0,04)	194 (23,9)	90,0

ПРИМЕЧАНИЕ: Параметры приведены как среднее значение (в/в путь) или среднее значение (п/к путь).

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 HCDR1

AASGYTFSSYVMH

5

SEQ ID NO: 2 HCDR2.1

VTSYDGTHEY

SEQ ID NO: 3 HCDR3

10 ARENNWAPDY

SEQ ID NO: 4 LCDR1

RASQDISNSLA

15 **SEQ ID NO: 5 LCDR2**

YAAFSLQS

SEQ ID NO: 6 LCDR3

YQYYNYPSA

20

SEQ ID NO: 7 HCDR2.2

VTSYDGTHEL

SEQ ID NO:8 Варибельная область HC (VH1)

25 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGTH
EYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARENNWAPDYWGQGLVT
VSS

SEQ ID NO: 9 Варибельная область HC (VH2)

30 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGTH
ELYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARENNWAPDYWGQGLVT
VSS

SEQ ID NO: 10 Варибельная область LC (VL)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNSLAWYQQKPGKAPKRLIYAAFSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCYQYYNYPFAFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 11 Линкер 1

5 DKTHTGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

SEQ ID NO: 12 Линкер 2

DKTGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

10 **SEQ ID NO: 13 Альбуминсвязывающий VHH**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPP

15 **SEQ ID NO: 14 Слияние HC Fab—альбуминсвязывающий VHH 1**

QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGYTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGTH
EYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREN NWAPDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGQGGG
20 GQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQA
PGKGRFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAR
PGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

SEQ ID NO: 15 Слияние HC Fab против G1TR—альбуминсвязывающий VHH 2

25 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGYTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGTH
ELYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREN NWAPDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGQGGG
GQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQA
30 PGKGRFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAR
PGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

SEQ ID NO: 16 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNSLAWYQQKPGKAPKRLIYAAFSLQSGVPS
35 RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCYQYYNYPFAFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD

EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 17 ДНК, кодирующая Слияние HC Fab против G1TR–

5 альбуминсвязывающий VHH 1
CAAGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGTGGCGGAGTGGTGCAGCCCGGAAGGTCCTTGCG
GCTCTCCTGTGCCGCTTCCGGCTACACCTTCTCGAGCTACGTGATGCACTGGGTGAG
ACAGGCACCGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCGTGACTTCCTACGACGGCACCC
ACGAGTATTACGCCGACTCAGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACCTCAA
10 AGAACACCCTGTATCTGCAAATGAACTCACTGCGGGCCGAGGACACTGCCGTGTAC
TACTGCGCGCGCGAAAACAACCTGGGCCCCTGACTACTGGGGACAGGGGACTCTGGT
CACTGTGTCGTCCGCCTCGACCAAGGGACCCTCCGTGTTTCCGCTGGCGCCAAGCAG
CAAGAGCACCTCGGGGGGAACCTGCAGCCTTGGGGTGCCTCGTGAAGGATTACTTCC
CCGAACCAGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGGGCCCTCACCAGTGGAGTGCACACTT
15 TCCCTGCGGTGCTGCAGTCCTCCGGACTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTACGCGTGC
CCAGCTCCTCACTGGGCACCCAGACCTACATTTGCAACGTGAACCATAAGCCGTCCA
ATACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCCTGCGACAAGACACACACCGGT
GGAGGAGGCCAGGGTGGAGGTGGACAAGGCGGCGGAGGTCAAGGCGGAGGAGGAC
AGGGTGGCGGAGGACAGGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGGGGCGGACTGGTGCA
20 GCCTGGCGGATCATTGCGGCTGTCGTGCGCGGCCTCCGGACGCTACATCGACGAGA
CAGCAGTGGCCTGGTTCAGACAGGCTCCCGGAAAGGGAAGAGAGTTCGTGGCCGGA
ATTGGCGGGGGAGTCGACATTACCTACTACGCCGATTCCGTGAAGGGTCGCTTTACC
ATCTCCCGGGACAATTCGAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACTCGCTGAGGCC
GGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCCGCCCCGCCGGGACGCCCCGCTGATCACGTC
25 CAAAGTCGCCGACCTGTACCCGTAAGGGGACAGGGTACCCTCGTGACCGTGTCCA
GCCCTCCC

SEQ ID NO: 18 ДНК, кодирующая Слияние HC G1TR–альбуминсвязывающий VHH 2

CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGTGGCGGAGTGGTGCAGCCCGGAAGGTCCTTGCG
30 GCTCTCCTGTGCCGCTTCCGGCTACACCTTCTCGAGCTACGTGATGCACTGGGTGAG
ACAGGCACCAGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCGTGACCTCCTACGACGGCACCC
ACGAGCTGTACGCCGACTCAGTGAAGGGCCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACCTCA
AAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAACTCACTGCGGGCCGAGGACACTGCCGTGTAC
CTACTGCGCGCGCGAAAATAACTGGGCCCCTGACTACTGGGGACAGGGGACTCTGG
35 TCACTGTGTCGTCCGCCTCGACCAAGGGACCCTCCGTGTTTCCGCTGGCGCCAAGCA

GCAAGAGCACCTCGGGGGGAACTGCAGCCTTGGGGTGCCTCGTGAAGGATTACTTC
CCCGAACCAGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGGGCCCTCACCAGTGGAGTGCACACT
TTCCCTGCGGTGCTGCAGTCCTCCGGACTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTCACGGTG
CCCAGCTCCTCACTGGGACCCAGACCTACATTTGCAACGTGAACCATAAGCCGTCC
5 AATACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCCTGCGACAAGACACACACCGG
TGGAGGAGGCCAGGGTGGAGGTGGACAAGGCGGCGGAGGTCAAGGCGGAGGAGGA
CAGGGTGGCGGAGGACAGGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGGGGCGGACTGGTGC
AGCCTGGCGGATCATTGCGGCTGTCTGTGCGCGGCCTCCGGACGCTACATCGACGAG
ACAGCAGTGGCCTGGTTCAGACAGGCTCCCGGAAAGGGAAGAGAGTTCGTGGCCGG
10 AATTGGCGGGGGAGTCGACATTACCTACTACGCCGATTCCGTGAAGGGTCGCTTTAC
CATCTCCCGGGACAATTTCGAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACTCGCTGAGGCC
GGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCCGCCCCGCCGGGACGCCCCGCTGATCACGTC
CAAAGTCGCCGACCTGTACCCGTACTGGGGACAGGGTACCCTCGTGACCGTGTCCA
GCCCTCCC

15
SEQ ID NO: 19 ДНК, кодирующая LC
GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCGCTGTCCGCTTCCGTGGGAGACAGAGTG
ACGATCACTTGTCTGGGCCAGCCAAGACATTAGCAACTCCCTGGCCTGGTACCAGCA
GAAGCCCGGCAAAGCACCCAAGAGGTTGATCTACGCGGCCTTTTCACTGCAATCCG
20 GAGTGCCGAGCCGGTTCTCCGGATCCGGTTCAGGGACCGAGTTCACCTTGACCATTA
GCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTGCCCCACTTACTACTGCTACCAGTATTACAATTACC
CATCGGCGTTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCTGCACCA
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTG
TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
25 AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC
ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG
AGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

30 **SEQ ID NO: 20 Полноразмерный GITR человека (без сигнального пептида)**
QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHC
PCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFGFLT
V
FPGNKTHNAVCPVPGSPPAEPLGWLTIVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPR
ETQLLLEVPPSTEDARSCQFP EEER GERSAEEKGRLGDLWV

SEQ ID NO: 21 ВКД GITR человека (без сигнального пептида)

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGD
PCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWT DCTQFGFLTV
FPGNKTHNAV CVPGSPPAE

5

SEQ ID NO: 22: Аминокислотная последовательность сигнального пептида

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Соединение, содержащее X, антигенсвязывающий фрагмент, который связывает G1TR человека (SEQ ID NO: 20) и содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где указанная VH содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная VL содержит определяющие комплементарность участки легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем
 - i. указанный HCDR1 содержит SEQ ID NO: 1,
 - ii. указанный HCDR2 содержит SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7,
 - 10 iii. указанный HCDR3 содержит SEQ ID NO: 3,
 - iv. указанный LCDR1 содержит SEQ ID NO: 4,
 - v. указанный LCDR2 содержит SEQ ID NO: 5, и
 - vi. указанный LCDR3 содержит SEQ ID NO: 6.
2. Соединение по п. 1, имеющее формулу:
15 X-L-M или M-L-X,
отличающееся тем, что M представляет собой фрагмент VHH, который связывается с сывороточным альбумином человека; и
L (если присутствует) представляет собой линкер.
3. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что указанный фрагмент VHH содержит
20 SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере от примерно 90% до примерно 99% сходства последовательности с указанной последовательностью.
4. Соединение по любому из пп. 2-3, отличающееся тем, что указанный фрагмент VHH слит с С-концом первого константного домена тяжелой цепи (CH1) фрагмента Fab за
25 счет L.
5. Соединение по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что X содержит VL, имеющую SEQ ID NO: 10.
6. Соединение по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что X содержит VH, имеющую SEQ ID NO: 8, или VH, имеющую SEQ ID NO: 9.
- 30 7. Соединение по любому из пп. 2-6, отличающееся тем, что L содержит пептидный линкер, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 23.
8. Соединение по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что X содержит легкую цепь (LC), представленную в SEQ ID NO: 16.

9. Соединение по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что X содержит НС, представленную в SEQ ID NO: 14, или НС, представленную в SEQ ID NO: 15.
10. Нуклеиновая кислота, содержащая SEQ ID NO: 17.
11. Нуклеиновая кислота, содержащая SEQ ID NO: 18.
- 5 12. Нуклеиновая кислота, содержащая SEQ ID NO: 19.
13. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, представленную в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.
14. Клетка, содержащая вектор по п. 12.
15. Способ получения соединения, включающий культивирование клетки по п. 13 в
- 10 условиях, обеспечивающих экспрессию указанного антитела, и выделение указанного экспрессированного антитела из культуральной среды.
16. Соединение, полученное способом по п. 14.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-9 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.
- 15 18. Способ лечения связанного с GITR нарушения путем ингибирования активности GITR у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-9 или фармацевтической композиции по п. 17.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанное связанное с GITR нарушение
- 20 представляет собой аутоиммунное нарушение, аллергическое заболевание, астму, atopический дерматит (АтД), воспалительное нарушение, воспаление суставов, артрит, ревматоидный артрит (РА), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), болезнь Крона (БК) или язвенный колит (ЯК).
20. Соединение по любому из пп. 1-9 для применения в терапии.
- 25 21. Соединение по любому из пп. 1-9 для применения при лечении аутоиммунного нарушения, аллергического заболевания, астмы, АтД, воспалительного нарушения, воспаления суставов, артрита, РА, ВЗК, БК или ЯК.
22. Применение соединения по п. 20 или 21 для изготовления лекарственного средства
- 30 для лечения аутоиммунного нарушения, аллергического заболевания, астмы, АтД, воспалительного нарушения, воспаления суставов, артрита, ревматоидного артрита, ВЗК, БК или ЯК.