

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047743**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.04

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

(21) Номер заявки
202292458

(22) Дата подачи заявки
2021.03.05

(54) **АНТИТЕЛА К GITR И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/986,494**

(32) **2020.03.06**

(33) **US**

(43) **2022.11.07**

(86) **PCT/US2021/021109**

(87) **WO 2021/178814 2021.09.10**

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

(56) **WO-A1-2017214548
WO-A2-2015187835**

**KNEE DEBORAH A ET AL.
"Rationale for anti-GITR cancer immunotherapy",
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, ELSEVIER,
AMSTERDAM NL, vol. 67, 31 August 2016
(2016-08-31), pages 1-10, XP029758970, ISSN:
0959-8049, DOI: 10.1016/J.EJCA.2016.06.028, the
whole document**

(72) Изобретатель:
**Бабб Роберт, Даджеон Дрю, Хуан Юй,
Молден Розалинн, Олсон Уильям,
Слиман Мэтью, Скокос Димитрис,
Ван Бэй (US)**

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

(57) В изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR), композиции, содержащие данные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и способы их применения, включающие, например, способы лечения с применением вышеуказанного.

B1

047743

047743

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с глюкокортикоид-индуцированным рецептором фактора некроза опухоли (GITR), и к способам их применения.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII под названием 10671WO01_Sequence_Listing_ST25.TXT, который был создан 05 марта 2021 г. и имеет размер приблизительно 60 килобайт. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе формата ASCII, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Сведения о предшествующем уровне техники

Глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR) является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF). Экспрессия GITR является конститутивно высокой на регуляторных Т-клетках, низкой/умеренной на наивных Т-клетках, NK-клетках и гранулоцитах и индуцируется при активации. GITR взаимодействует со своим лигандом GITRL, который главным образом экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках. Активация рецептора GITR может как усиливать пролиферацию и функцию эффекторных Т-клеток, так и ослаблять супрессию, индуцированную регуляторными Т-клетками. Следовательно, модуляция активности GITR может служить основой для иммунотерапии рака и иммунных нарушений. Таким образом, существует потребность в средствах, например антителах, которые модулируют активность GITR.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR). Антитела, представленные в данном документе, применимы, помимо всего прочего, для нацеливания на иммунные клетки, например, эффекторные Т-клетки, регуляторные Т-клетки и естественные клетки-киллеры (NK), которые экспрессируют GITR. Данные антитела особенно применимы потому, что их усечение *in vivo* сведено к минимуму.

Антитела, представленные в данном документе, могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент) и могут быть модифицированы для изменения функциональности, например, с устранением остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Иллюстративные антитела к GITR, представленные в данном документе, перечислены в табл. 7, 8 и 9. В табл. 7 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из иллюстративных антител к GITR. В табл. 8 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к GITR. В табл. 9 представлены идентификаторы последовательностей для полноразмерных последовательностей тяжелой и легкой цепей иллюстративных антител к GITR.

В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 28, 34 и 40; и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 28, 34 и 40; и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32, 38 и 44; и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 20.

В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, модифицированной посредством мутации N101D, N101E, N101S или N101T; и три CDR легкой цепи в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с GITR, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три

CDR тяжелой цепи в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, модифицированной посредством мутации N101A, N101F, N101G, N101H, N101I, N101K, N101L, N101M, N101P, N101Q, N101R, N101V, N101W или N101Y; и три CDR легкой цепи в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, модифицированной посредством мутации S103A, S103D, S103E, S103F, S103G, S103H, S103I, S103K, S103L, S103M, S103N, S103P, S103Q, S103R, S103T, S103V, S103W или S103Y; и три CDR легкой цепи в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

Однозначно исключено антитело, представленное в табл. 1 в данном документе и раскрытое в патентном документе США 2017/0355774A1, где в антителе отсутствует модификация или мутация N101 или S103 в HCVR.

В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, содержащие HCVR и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность HCDR3, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 7. HCVR может дополнительно содержать аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 7 или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. LCVR может содержать аминокислотную последовательность LCVR из перечисленных в табл. 7 или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности HCVR, перечисленные в табл. 7, в паре с аминокислотной последовательностью LCVR, перечисленной в табл. 7. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к GITR, перечисленных в табл. 7. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22/10, 28/10, 34/10 и 40/10.

В настоящем описании также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 7.

В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 7, в паре с аминокислотной последовательностью LCDR3, представленной в табл. 7. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к GITR, перечисленных в табл. 7. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24/16, 30/16, 36/16 и 42/16.

В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, содержащие совокупность из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), которые содержатся в любом из иллюстративных антител к GITR, перечисленных в табл. 7. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-24-12-14-16, 4-6-30-12-14-16, 4-6-36-12-14-16 и 4-6-42-12-14-16.

В соответствующем варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, содержащие совокупность из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), которые содержатся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенной для любого из иллюстративных антител к GITR, перечисленных в табл. 7. Например, в настоящем изобретении включены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают GITR, содержащие совокупность аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, которые содержатся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24/16, 30/16, 36/16 и 42/16.

В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к GITR или их части. Например, в настоящем изобретении представлены молекулы нуклеиновой

кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 7; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 8, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности LCVR, перечисленные в табл. 7; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность LCVR, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты, перечисленных в табл. 8, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 7; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 8, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит совокупность из трех CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), где совокупность аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является такой, как определено для любого из иллюстративных антител к GITR, перечисленных в табл. 7.

В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 7, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 7. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 8, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 8, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В определенных вариантах осуществления в соответствии с данным аспектом, представленным в данном документе, молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR получены из одного и того же антитела к GITR, приведенного в табл. 7.

В настоящем изобретении также представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к GITR. Например, в настоящем изобретении включены рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, т. е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 7. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, например эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки-хозяева млекопитающих, в которые были введены такие векторы. Примеры эукариотических клеток-хозяев включают клетки дрожжей и млекопитающих, например клетки позвоночных, такие как линия клеток мыши, крысы, обезьяны или человека, например, клетки НКВ11, клетки PER.C6, клетки НЕК или клетки CHO. Также в данном документе представлены способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким способом антител и фрагментов антител.

В настоящем изобретении включены антитела к GITR, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции, представляющей собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других вариантах применения модификацию галактозилирования можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В другом аспекте настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которые специфически связывают GITR, и фармацевтически приемлемый носитель. В сходном аспекте в настоящем изобретении представлена композиция, которая представляет собой комбинацию из антитела к GITR и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к GITR в комбинацию обеспечивается преимущество.

В настоящем изобретении также представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к GITR, конъюгированное с цитотоксическим средством. Иллюстративные виды комбинированной терапии, совместные составы и ADC, включающие антитела к GITR по настоящему изобретению, раскрыты в другом месте данного документа.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлены фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которые специфически связывают GITR, для применения в изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для уничтожения опухолевых клеток, или для подавления или ослабления роста опухолевых клеток, или для лечения посредством другого способа пациента, страдающего раком. В некоторых аспектах фармацевтические композиции объединяют в терапевтическую комбинацию со вторым терапевтическим средством. В некоторых аспектах второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых аспектах ингибитор PD-1 представляет собой цемиплимаб.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлены терапевтические способы уничтожения опухолевых клеток, или подавления или ослабления роста опухолевых клеток, или лечения посредством другого способа пациента, страдающего раком, с применением антитела к GITR или антигенсвязывающей части антитела, представленного в данном документе. Терапевтические способы согласно данному аспекту, представленному в данном документе, включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, представленные в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. Нарушение, подлежащее лечению, представляет собой любое заболевание или патологическое состояние, которое ослабляют, облегчают, подавляют или предупреждают путем нацеливания на GITR, и/или путем увеличения пролиферации или функции Т-клеток, и/или подавления супрессорной активности, индуцированной регуляторными Т-клетками. В некоторых аспектах способы дополнительно включают введение второго терапевтического средства пациенту или субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых аспектах второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых аспектах ингибитор PD-1 представляет собой цемиплимаб.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлено применение рекомбинантного человеческого антитела или его фрагмента, которые специфически связывают GITR, или фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, для применения в изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для уничтожения опухолевых клеток, или для подавления или ослабления роста опухолевых клеток, или для лечения посредством другого способа пациента, страдающего раком.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлены терапевтические способы уничтожения опухолевых клеток, или подавления или ослабления роста опухолевых клеток, или лечения посредством другого способа пациента, страдающего раком, с применением комбинации антитела к GITR или антигенсвязывающей части антитела к GITR и антитела к PD1 или антигенсвязывающей части антитела к PD1. В некоторых аспектах антитело к PD1 представляет собой цемиплимаб. Терапевтические способы согласно данному аспекту, представленные в данном документе, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к GITR и к PD1 или композиции на основе антигенсвязывающего фрагмента. Нарушение, подлежащее лечению, представляет собой какое-либо заболевание или патологическое состояние, которое ослабляют, облегчают, подавляют или предупреждают путем нацеливания как на GITR, так и на PD1.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту (i) антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и (ii) цемиплимаба. В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлены способы применения антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:24, LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 в изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для применения в способе лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают введение субъекту антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента и цемиплимаба. В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения представлены антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способе лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту (i) антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и (ii) цемиплимаба. В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

Другие варианты осуществления будут изложены в следующем подробном описании.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано увеличение в отношении усечения, выявленное у CompAb1 при инкубации в сыворотке крови обезьяны или PBS. Расчетная скорость усечения в сыворотке крови обезьян составляла примерно 1,5%/день, а в PBS - примерно 0,5%/день.

На фиг. 2 показано увеличение в отношении усечения, выявленное у CompAb1 при введении мышам дозы 10 мг/кг. CompAb1 добавляли в сыворотку крови мыши и PBS до соосаждения (аффинная очистка) в качестве контроля день 0.

На фиг. 3 показано увеличение усечения, выявленное у антитела CompAb1, и его отсутствие в вариантах mAb1 или mAb2 после инкубации в сыворотке крови человека, обедненной по IgG. Антитело CompAb1 демонстрировало скорость усечения 1,9%/день на C-конце и 0,7%/день на N-конце.

На фиг. 4 показано увеличение в отношении усечения, выявленное у антитела CompAb1 (также называемого как CompAb1), и его отсутствие в вариантах mAb1 или mAb2 после инкубации *in vitro* в мышинной сыворотке крови. В мышинной сыворотке расчетная скорость усечения у антитела CompAb1 составляла по меньшей мере 1,7%/день.

На фиг. 5A, фиг. 5B и фиг. 5C показано связывание mAb1 и изотипического контрольного IgG1 с поверхностью клетки в диапазоне концентраций (от 18 пМ до 300 нМ) на клетках Jurkat/hCD20 (фиг. 5A), Jurkat/hCD20/hGITR (фиг. 5B) и Jurkat/hCD20/MfGITR (фиг. 5C). Связывание определяли посредством антитела, меченого Alexa647, к IgG человека с использованием проточной цитометрии. Значения интенсивности флуоресценции наносили на график как геометрическую MFI. h: человек; Mf: *Mасаса fascicularis* (яванский макак).

На фиг. 6 показано связывание антител с активированными (CD25⁺) человеческими первичными Т-клетками. Первичные человеческие Т-клетки от 4 отдельных доноров стимулировали *in vitro* гранулами, покрытыми антителом к CD2 / антителом к CD3 / антителом к CD28. Связывание с клеточной поверхностью mAb1, конъюгированного с AF647, и изотипического контроля IgG1, конъюгированного с AF647, в диапазоне концентраций (от 8 пМ до 200 нМ) на CD25⁺ и CD25⁻ человеческих первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках определяли с использованием проточной цитометрии. Значения интенсивности флюоресценции наносили на график как геометрическую MFI. Ну: человек.

На фиг. 7 показано связывание антител с первичными CD69⁺ Т-клетками яванского макака. Первичные Т-клетки яванского макака от 4 отдельных доноров стимулировали *in vitro* гранулами, покрытыми антителом к CD2/ антителом к CD3/антителом к CD28. Связывание с клеточной поверхностью mAb1, конъюгированного с AF647, и изотипического контроля IgG1, конъюгированного с AF647, в диапазоне концентраций (от 8 пМ до 200 нМ) на CD69⁺ и CD69⁻ первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках яванского макака определяли с использованием проточной цитометрии. Значения интенсивности флюоресценции наносили на график как геометрическую MFI. Mf: *Macaes fascicularis* (яванский макак).

На фиг. 8А, фиг. 8В, фиг. 8С и фиг. 8D показана Fc-опосредованная активность NFAT в эффекторных клетках Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a и Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a. Клетки Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a и Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a инкубировали с mAb1 или изотипическим контролем IgG1 при концентрации от 916 фМ до 60 нМ или IgG1 к CD20 при концентрации от 45,8 фМ до 3 нМ, в том числе контролем без добавления антитела, и клетками Jurkat/hCD20 (фиг. 8А, 8С), или Jurkat/hCD20/hG1TR (фиг. 8В), или Jurkat/hCD20/MfG1TR (фиг. 8D) (соотношение эффекторных клеток и целевых клеток 1:2). Передачу сигналов в клетках Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a и Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a определяли по активности люциферазы и измеряли путем количественного определения люминесцентного сигнала, выраженного в относительных световых единицах (RLU). Данные получены по результатам анализа, выполненного в лунках в двух повторностях, и они представлены на графике как среднее значение ± стандартное отклонение.

На фиг. 9А, фиг. 9В, фиг. 9С, фиг. 9D, фиг. 9Е и фиг. 9F показано опосредование антителами ADCC в отношении Т-клеток Jurkat, сконструированных для экспрессии G1TR человека или яванского макака. Целевые клетки Jurkat/hCD20 (фиг. 9А, 9D), Jurkat/hCD20/hG1TR (фиг. 9В, 9Е) или Jurkat/hCD20/MfG1TR (фиг. 9С, 9F) в течение 3,5 часов инкубировали с человеческими НК-клетками (соотношение эффекторных клеток и целевых клеток 5:1) и mAb1, изотипическим контрольным IgG1 и IgG1 к CD20 в концентрациях от 9,5 фМ до 10 нМ. Цитотоксичность определяли с использованием коммерчески доступного анализа CytoTox-Glo, который представляет собой люминесцентный анализ цитотоксичности, посредством которого измеряют относительное количество мертвых клеток в клеточных популяциях с применением считывания люминесценции. Пунктирной линией на каждом графике обозначен уровень неспецифической цитотоксичности, наблюдаемый при добавлении НК-клеток в отсутствие антител. Данные анализа, выполненного в лунках в трех повторностях, нанесены на график как среднее значение ± SD.

На фиг. 10А, фиг. 10В, фиг. 10С и фиг. 10D показано опосредование антителами ADCC в отношении первичных человеческих Т-клеток. Человеческие первичные Treg (фиг. 10А, 10С) и CD8⁺ Т-клетки (фиг. 10В, 10D) (целевые клетки) выделяли из РВМС (3 донора), стимулировали и размножали в культуре и инкубировали с человеческими первичными НК-клетками (эффекторными клетками), выделенными из цельной крови (2 донора) (соотношение эффекторных клеток и целевых клеток 5:1). mAb1, представляющее собой изотипический контроль IgG1, или IgG1 к CD3 в концентрациях от 169 фМ до 10 нМ инкубировали с эффекторными клетками и целевыми клетками в течение 3,5 часа. Цитотоксичность определяли с использованием коммерчески доступного анализа CytoTox-Glo, который представляет собой люминесцентный анализ цитотоксичности, посредством которого измеряют относительное количество мертвых клеток в клеточных популяциях. Пунктирной линией на каждом графике обозначен уровень неспецифической цитотоксичности, наблюдаемый при добавлении НК-клеток в отсутствие антител. Данные анализа, выполненного в лунках в трех повторностях, нанесены на график как среднее значение ± SD.

На фиг. 11А, фиг. 11В и фиг. 11С показано опосредование антителами ADCP в отношении Т-клеток Jurkat, сконструированных для экспрессии G1TR человека или яванского макака. Целевые клетки Jurkat/hCD20 (фиг. 11А), Jurkat/hCD20/hG1TR (фиг. 11В) или Jurkat/hCD20/MfG1TR (фиг. 11С), меченные красителем CellTrace CFSE, инкубировали в течение 1-2 часов с человеческими первичными фагоцитами моноцитарного происхождения, мечеными красителем CellTrace Far Red, и mAb1, изотипическим контролем IgG1 или IgG1 к CD20 в концентрациях от 381 фМ до 100 нМ, в том числе контролем без добавления антител. Фагоцитоз анализировали посредством визуализации флюоресценции в системе Omega Phoenix High-Content Screening и измеряли как интенсивность зеленой флюоресценции (целевые клетки, меченные CFSE, выявляемые в канале эмиссии при 488 нм) в популяции клеток, меченных красителем Far Red (фагоциты, меченные красителем Far Red, выявляемые в канале эмиссии при 647 нм), приведенную в относительных единицах флюоресценции (RFU). Данные анализа, выполненного в лунках в двух повторностях, нанесены на график как среднее значение ± SD.

На фиг. 12А, фиг. 12В, фиг. 12С, фиг. 12D, фиг. 12Е и фиг. 12F показано влияние антитела к G1TR

на пролиферацию первичных CD4⁺ Т-клеток, опосредованную антителом к CD3. Обогащенные человеческие первичные Т-клетки (6 доноров) инкубировали с серийно разведенным mAb1 или изотипическим контролем IgG1 в диапазоне концентраций (от 32 фМ до 133 нМ), в том числе контролем без добавления антител, в присутствии фиксированной концентрации (2 нМ) стимулирующего антитела к CD3 и вспомогательных клеток НЕК293/FcγR2b. Данные получены по результатам анализа, выполненного в лунках в трех повторностях, и они представлены на графике как среднее значение ± стандартное отклонение. Пролиферацию Т-клеток измеряли путем выявления распада трития (из третирированного тимидина, включенного в делящиеся клетки) и приводили в СРМ. Пунктирной линией на каждом графике обозначен уровень пролиферации, наблюдаемый при добавлении стимулирующего антитела к CD3 в отсутствие титруемого антитела.

На фиг. 13 показаны влияния антитела к GITR на связывание человеческого GITR человека с человеческим GITR-L. Связывание человеческого белка GITR, hGITR.mmH, в диапазоне концентраций (от 3,4 пМ до 200 нМ) с иммобилизованным человеческим GITR-L оценивали посредством ELISA и определяли значения EC₅₀ для связывания. Рекомбинантный hGITR.mmH в фиксированной концентрации (1,5 нМ), основанной на значениях EC₅₀, рассчитанных для связывания с hGITR-L, предварительно инкубировали с mAb1 или изотипическим контролем IgG1 в диапазоне концентраций (от 51 пМ до 3 мкМ) и добавляли в лунки, содержащие иммобилизованный человеческий GITR-L, для определения способности антител блокировать связывание hGITR.mmH с иммобилизованным человеческим GITR-L. Связывание hGITR.mmH выявляли с помощью HRP-конъюгированного антитела к сМус с использованием субстрата ТМВ, а OD₄₅₀ измеряли спектрофотометрически.

На фиг. 14 показано влияние антитела к GITR на ADC. Целевые клетки Jurkat/hCD20, Jurkat/hCD20/hGITR или Jurkat/hCD20/MfGITR инкубировали с или без 5% NHS и mAb1, изотипическим контролем IgG1 и IgG1 к CD20 в концентрациях в диапазоне от 477 фМ до 500 нМ, в том числе без добавления контрольного антитела с заданной концентрацией 119 фМ в течение 3,5 часа. Цитотоксичность определяли с использованием коммерчески доступного анализа CytoTox-Glo, который представляет собой люминесцентный анализ цитотоксичности, посредством которого измеряют относительное количество мертвых клеток в клеточных популяциях. Пунктирной линией на каждом графике обозначен уровень неспецифической цитотоксичности, наблюдаемый при добавлении 5% NHS в отсутствие антител. Данные анализа, выполненного в лунках в трех повторностях, нанесены на график как среднее значение ± SD.

На фиг. 15А и фиг. 15В показано, что антитело к GITR не может образовывать иммунные комплексы, способные связывать C1q, при инкубации с растворимым GITR. mAb1 к GITR или изотипический контроль IgG1 в концентрации 30 нМ инкубировали с рекомбинантным эктодоменом человеческого белка GITR в мономерной форме, hGITR.mmH (фиг. 15А), или димером hGITR.mFc (фиг. 15В) при молярном соотношении 1:1. Также анализировали контрольные лунки, содержащие только антитело, hGITR.mmH или hGITR.mFc. Все образцы перед анализом разводили в 50 раз в растворе для анализа из набора. Положительные контроли с высоким (38 мкг экв./мл) и низким (15 мкг экв./мл) HAGG анализировали параллельно, и связывание C1q в каждом контрольном образце наблюдали в пределах ожидаемого диапазона от 11 до 26 мкг экв./мл и менее 4 мкг экв./мл соответственно. Пунктирной линией обозначен показатель 4 мкг экв./мл. Данные по образцам, исследованным в трех повторностях, нанесены на график как среднее значение ± стандартное отклонение.

На фиг. 16А и фиг. 16В показана усиленная секреция IL-2 первичными CD3⁺ Т-клетками, стимулированными антителом CD3, от донора 555105 (фиг. 16А) и донора 555130 (фиг. 16В), обработанных цемиплимабом в присутствии человеческого PD-L1.

Обогащенные человеческие первичные Т-клетки инкубировали с серийно разведенными mAb1 или изотипическим контролем IgG1 в присутствии фиксированной концентрации (20 нМ) цемиплимаба или изотипического контроля IgG4^P в диапазоне концентраций (от 76 фМ до 200 нМ) в присутствии RBL-2H3/αCD3 или RBL-2H3/αCD3/hPD-L1 при соотношении антигенпрезентирующих клеток и Т-клеток 1:2. Данные получены по результатам анализа, выполненного в лунках в трех повторностях, и они представлены на графике как среднее значение ± стандартное отклонение. Секрецию IL-2 измеряли с применением набора Human IL-2 от PerkinElmer в соответствии с протоколом производителя.

На фиг. 17 показано истощение внутриопухолевых регуляторных Т-клеток и увеличение соотношения CD8⁺ Т-клетки/регуляторные Т-клетки под воздействием антител к GITR у гуманизированных мышей GITR/GITR-L, которым подкожно вводили клетки аденокарциномы толстой кишки мышей MC38.

На фиг. 18 показано, что введение 1 мг/кг цемиплимаба в комбинации с 10 мг/кг mAb1 приводит в результате к значительно повышенному снижению роста опухоли MC38 у гуманизированных мышей GITR/GITR-L-PD-1 по сравнению с монотерапией цемиплимабом.

На фиг. 19А, фиг. 19В, фиг. 19С, фиг. 19D и фиг. 19Е показана более высокая частота клиренса опухолевых клеток MC38 у мышей, получавших лечение 1 мг/кг цемиплимаба в комбинации с 0,1 мг/кг (фиг. 19Е), 1,0 мг/кг (фиг. 19D) и 10 мг/кг mAb1 (фиг. 19С) по сравнению с монотерапией цемиплимабом (фиг. 19В). Обработка изотипическими контролями показана на фиг. 19А.

На фиг. 20 показана более высокая выживаемость у мышей с опухолями MC38, получавших лечение цемиплимабом в дозе 1 мг/кг в комбинации с mAb1 в дозе 10 мг/кг, по сравнению с монотерапией цемиплимабом.

Подробное описание

Модуляция микроокружения опухоли путем нацеливания на внутриопухолевые иммунные клетки представляет собой терапевтический подход к лечению рака. В частности, нацеливание на костимулирующие и коингибирующие рецепторы контрольных точек иммунного ответа, экспрессируемые на клеточной поверхности внутриопухолевых Т-клеток, может усиливать эндогенные противоопухолевые ответы за счет повышения цитотоксичности в отношении опухолевых клеток и подавления местной иммуносупрессии.

Представитель 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF18), также известный под названием глюкокортикоид-индуцированный белок, родственник рецептору фактора некроза опухоли (GITR), представляет собой костимулирующий рецептор, который экспрессируется на регуляторных Т-клетках (Treg) и клетках, отличных от Treg, называемых обычными Т-клетками, а также на других клетках иммунной системы. GITR экспрессируется на низких уровнях на Т-клетках, находящихся в состоянии покоя, и положительно регулируется после активации Т-клеток с более высокой экспрессией на активированных Treg, чем на активированных обычных Т-клетках (Shimizu et al., *Nature Immunology*, 23(2): 135-142, 2002) (Krausz et al., *The Scientific World Journal*, 7: 533-66, 2007) (Knee et al., *European Journal of Cancer*, 67: 1-10, 2016). Дифференциальный профиль экспрессии GITR на активированных Treg делает его перспективной мишенью для предпочтительного истощения активированных внутриопухолевых Treg с усилением противоопухолевого иммунитета.

Моноклональные антитела mAb1 и mAb2 представляют собой антитела IgG1-агонисты человеческого GITR, которые преимущественно истощают активированные Treg. Антитела-агонисты GITR могут индуцировать противоопухолевый иммунитет путем преимущественного истощения внутриопухолевых Treg FcγR-зависимым образом (например, антителозависимая клеточная цитотоксичность/фагоцитоз [ADCC/ADCP]), что коррелирует с экспрессией GITR на поверхности клеток. Эти антитела к GITR могут действовать синергически с блокированием контрольных точек запрограммированной гибели клеток-1 (PD-1), что приводит к продолжительным противоопухолевым ответам в доклинических моделях. В некоторых аспектах антитело к GITR объединяют в комбинацию с ингибитором PD-1, например цемиплимабом. Не ограничиваясь теорией, ингибитор PD-1 может восстанавливать способность антитела к GITR усиливать активацию Т-клеток, стимулированную антителом к CD3. В некоторых аспектах объединение в терапевтическую комбинацию антитела к GITR, раскрытого в данном документе, с ингибитором PD-1 приводит в результате к более значительному снижению роста опухоли по сравнению с применением только ингибитора PD-1. В некоторых аспектах объединение в терапевтическую комбинацию антитела к GITR, раскрытого в данном документе, с ингибитором PD-1 приводит в результате к более высокой частоте клиренса опухолевых клеток по сравнению с применением только ингибитора PD-1. В некоторых аспектах объединение в терапевтическую комбинацию антитела к GITR, раскрытого в данном документе, с ингибитором PD-1 приводит в результате к более высокой выживаемости субъектов с опухолями по сравнению с применением только ингибитора PD-1.

Перед описанием настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемое в данном документе выражение "приблизительно" при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отклоняться от указанного значения не более чем на 1%. Например, используемое в данном документе выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на патент и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли

Выражения "глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли", "GITR" и т. п., используемые в данном документе, относятся к человеческому глюкокортикоид-индуцированному рецептору фактора некроза опухоли, содержащему аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 49 (№ доступа в NCBI NP_004186.1). Выражение "GITR" включает как мономерные, так и

мультимерные молекулы G1TR. Используемое в данном документе выражение "мономерный человеческий G1TR" означает белок G1TR или его часть, который не содержит или не обладает какими-либо доменами мультимеризации и который существует при нормальных условиях в виде одной молекулы G1TR без непосредственной физической связи с другой молекулой G1TR. Иллюстративной мономерной молекулой G1TR является молекула, называемая в данном документе "hG1TR.mmh", которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45 (см., например, пример 3 в данном документе). Используемое в данном документе выражение "димерный человеческий G1TR" означает конструкцию, содержащую две молекулы G1TR, соединенные друг с другом посредством линкера, ковалентной связи, нековалентной связи или посредством мультимеризирующего домена, такого как Fc-домен антитела. Иллюстративные димерные молекулы G1TR включают те молекулы, которые упоминаются в данном документе под названием "hG1TR.mFc" и "hG1TR.hFc", содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47 соответственно.

Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе относятся к человеческому варианту соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они получены от видов, отличных от человека. Таким образом, выражение "G1TR" означает человеческий G1TR, если не указано, что он получен от видов, отличных от человека, например, "G1TR мыши", "G1TR обезьяны" и т. д.

Используемое в данном документе выражение "G1TR, экспрессируемый на клеточной поверхности" означает один или более белков G1TR или их внеклеточный домен, который экспрессируется/которые экспрессируются *in vitro* или *in vivo* на поверхности клетки, так что по меньшей мере часть белка G1TR располагается на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. "G1TR, экспрессируемый на клеточной поверхности", может предусматривать белок G1TR, экспрессируемый на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок G1TR, или состоять из него. В качестве альтернативы "G1TR, экспрессируемый на клеточной поверхности" может предусматривать белок G1TR, экспрессируемый на поверхности клетки, или состоять из него, которая в нормальном состоянии не экспрессирует человеческий G1TR на своей поверхности, но была искусственно модифицирована для экспрессии G1TR на своей поверхности.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител

Используемый в данном документе термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с определенным антигеном (например, G1TR). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления, представленных в данном документе, FR антитела к G1TR (или его антигенсвязывающей части) может быть идентичной человеческим последовательностям зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании анализа на основе параллельного сравнения двух или более CDR.

В некоторых вариантах осуществления, представленных в данном документе, антитела к G1TR, представленные в данном документе, представляют собой человеческие антитела. Используемый в данном документе термин "человеческое антитело" предназначен для включения антител, содержащих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела, представленные в данном документе, могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако подразумевается, что термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, привиты на каркасные последовательности человека. Термин "человеческое антитело" не включает встречающиеся в природе молекулы, которые обычно существуют без модификации или вмешательства/манипуляции со стороны человека в природном, немодифицированном живом организме.

Используемое в данном документе выражение "антитело к G1TR" включает как моновалентные, так

и моноспецифические бивалентные антитела с одной специфичностью, а также биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает GITR, и второе плечо, которое связывает второй антиген (мишень), при этом плечо антитела к GITR содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 7 данного документа. Выражение "антитело к GITR" также включает конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к GITR или его антигенсвязывающую часть, конъюгированные с лекарственным средством или токсином (т. е. цитотоксическим средством). Выражение "антитело к GITR" также включает конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие антитело к GITR или его антигенсвязывающую часть, конъюгированные с радионуклидом.

Антитела, представленные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Подразумевается, что используемый в данном документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют посредством рекомбинантных способов, такие как антитела, экспрессируемые с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описанные ниже), антитела, выделяемые из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описанные ниже), антитела, выделяемые из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам человеческих иммуноглобулинов (смотри, например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые посредством любых других способов, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или если используют животное, трансгенное по последовательностям человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и родственны им, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или ему подобный означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать посредством равновесной константы диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М или меньше (например, меньшее значение K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т. п. Как описано в данном документе, антитела были идентифицированы посредством анализа в режиме реального времени с использованием безмаркерной интерферометрии биослоев на биосенсоре Octet® HTX, который специфически связывается с GITR. Более того, полиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в GITR и одним или более дополнительными антигенами или биспецифическими антителами, которые связываются с двумя разными областями GITR, тем не менее, считаются антителами, которые "специфически связываются", как используется в данном документе.

Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем моноклональным антителам, которые характеризуются аффинностью связывания с hGITR, выраженной в виде K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-8} М; по меньшей мере приблизительно 10^{-9} М; по меньшей мере приблизительно 10^{-10} М или по меньшей мере приблизительно 10^{-11} М, что измерено посредством анализа в режиме реального времени с использованием безмаркерной интерферометрии биослоев, например посредством биосенсора Octet® HTX, или посредством поверхностного плазмонного резонанса, например посредством BIACORE™, или посредством определения аффинности в растворе с использованием ELISA.

Под терминами "медленная скорость диссоциации", "Koff" или "kd" подразумевается антитело, которое диссоциирует из комплекса с hGITR с константой скорости, составляющей 1×10^{-3} с⁻¹ или меньше или 1×10^{-4} с⁻¹ или меньше, что определено посредством анализа в режиме реального времени с использованием безмаркерной интерферометрии биослоев, например посредством биодатчика Octet® HTX, или поверхностного плазмонного резонанса, например посредством BIACORE™.

Термин " K_D ", используемый в данном документе, относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия определенных антитела и антигена.

Антитела, представленные в данном документе, могут представлять собой выделенные антитела. Термин "выделенное антитело", используемый в данном документе, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из по меньшей мере одного компонента своего естественного окружения. Например, антитело, которое было отделено или удалено от по меньшей мере одного компонента организма или из ткани или клетки, в которых антитело существует или продуцируется естественным путем, является "выделенным антителом", предназначенным для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные

антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может по сути не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемый в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться.

Используемый в данном документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела посредством любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии геной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей вариabельные и необязательно константные домены антител, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции с использованием методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или более вариabельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. п.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариabельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарная область (CDR), такая как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диантитела, триантитела, тетраантитела, мини-антитела, наноантитела (например, моновалентные наноантитела, бивалентные наноантитела и т. д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка небольшого размера (SMIP) и вариabельные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один вариabельный домен. Вариabельный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится в смежном положении или в одной рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариabельная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариabельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариabельных и константных доменов, которые могут находиться в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, включают (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3 и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации вариabельных и константных доменов, в том числе любых иллюстративных конфигурациях, представленных выше, вариabельные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полноразмерной шарнирной или линкерной области или ее части. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными вариabельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций вариabельных и константных доменов, изложенных выше, нековалентно связанных друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

Как и в случае с молекулами полного антитела антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический анти-

генсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом того же антигена. Любой формат полиспецифических антител, в том числе иллюстративные форматы биспецифических антител, раскрытые в данном документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных методик, доступных из уровня техники.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию размером приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры связаны вместе межцепочечной дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно соединенных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы крайне сложно разделить даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных изоформах интактного IgG обусловлена без ограничения структурными отличиями, ассоциированными с изоформой шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительно снизить частоту появления второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, как правило, наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, содержащие одну или более мутаций в шарнире, области C_H2 или C_H3, которые могут быть необходимы, например при получении, для обеспечения улучшения выхода требуемой формы антитела.

Модификации антител и их антигенсвязывающих фрагментов

Антитела к GITR, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с последовательностями антител, представленных в данном документе, или могут быть подвергнуты естественным или искусственным изменениям. В определенных вариантах осуществления каркасные области антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека, например, идентичными последовательностям антител, представленным в данном документе, или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Одна или более аминокислот в данной каркасной области (или одной или более каркасных областей) могут быть заменены, и при этом замена(замены) может(могут) являться консервативной(консервативными) или неконсервативной(неконсервативными) заменами. Также возможны замена одного или более остатков CDR или удаление одной или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых для связывания можно обойтись без одной или двух CDR. Padlan et al. (1995 *FASEB J.* 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, исходя из опубликованных кристаллических структур, и сделали заключение, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR в действительности контактируют с антигеном. Padlan также выявил множество антител, в которых одна или две CDR не имели аминокислотных остатков, вступающих в контакт с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 *J Mol Biol* 320:415-428). Таким образом, представленные в данном документе антитела могут быть эффективно модифицированы в областях CDR и/или каркасных областях, при условии, что модифицированное антитело сохраняет одну или более требуемых характеристик, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с hGITR при EC₅₀, составляющей менее приблизительно 10⁻⁹ M; и/или демонстрирует снижение скорости усечения по сравнению с антителом без модификации N101 или S103.

Модификации в данных CDR могут быть выполнены в отношении последовательности CDR из антитела, представленного в данном документе, и такие модификации могут включать консервативные или неконсервативные замены. Требуемые замены могут быть определены посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Например, один или более остатков CDR могут быть заменены аминокислотой, занимающей соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей.

Кроме того, его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело, описанное в данном документе, однако модифицированное так, чтобы пропускать одну или более из CDR и/или одну или более из каркасных областей, при условии, что модифицированное антитело (также известное как антигенсвязывающий фрагмент) сохраняет способность к связыванию с hGITR.

Остатки CDR, которые не вступают в контакт с антигеном, можно идентифицировать на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в HCDR2 зачастую не требуются) среди областей CDR согласно Кабату, находящимся за пределами CDR согласно Чотиа, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, можно модифицировать с удалением или заменой данной CDR, в частности той, которая не контактирует с антигеном. CDR легкой цепи могут быть заменены, например, на универсальные CDR легкой цепи.

Полностью человеческие моноклональные антитела к GITR, представленные в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях

и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии или по сравнению с последовательностями, представленными в данном документе. Такие модификации или мутации могут быть легко определены путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител, или путем сравнения аминокислотных последовательностей с последовательностями антител, представленных в данном документе, например, любой из последовательностей антител, представленных в табл. 7.

В настоящем изобретении включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR модифицированы, при условии, что модифицированное антитело сохраняет одну или более из требуемых характеристик, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с hGITR с EC₅₀, составляющей менее приблизительно 10⁻⁹ М; и/или демонстрирует снижение скорости усечения *in vivo* или *in vitro*. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более модификаций каркасной области и/или CDR, могут быть легко протестированы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные биологические антагонистические или агонистические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. п. Настоящим изобретением охвачены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные посредством этого общего способа.

В настоящем изобретении включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR мутированы с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) из последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) из другой последовательности зародышевой линии человека, или с получением консервативной аминокислотной замены из соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе в совокупности обозначены как "мутации зародышевой линии"). Специалист средней квалификации в данной области техники, принимая за основу раскрытые в данном документе последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей, легко может получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все из каркасных остатков и/или остатков CDR в доменах V_H и/или V_L являются подвергнутыми обратной мутации в остатки, встречающиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергнуты обратной мутации до исходной последовательности зародышевой линии, например, только подвергнутые мутации остатки, находящиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только подвергнутые мутации остатки, находящиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных остатков и/или остатков CDR подвергают мутации в соответствующий(соответствующие) остаток(остатки) последовательности другой зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или областях CDR, где, например, определенные отдельные остатки подвергнуты мутации с получением соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или подвергнуты мутации с получением соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать в отношении одного или более необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. п. Настоящим изобретением охвачены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные посредством этого общего способа.

В настоящем изобретении также включены антитела к GITR, содержащие варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющие одну или более консервативных замен. Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т. д. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 7 в данном документе.

Термин "идентичность по сути" или "по сути идентичный" по отношению к нуклеиновой кислоте

или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании с учетом соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой последовательностью нуклеиновой кислоты (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, что измерено с помощью хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая по сути идентична молекуле референтной нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по сути сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый молекулой референтной нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "сходство по сути" или "по сути сходный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, с применением стандартных значений штрафа за открытие гэпа по умолчанию характеризуются по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности. В некоторых аспектах положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, если две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой регулировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; (3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, которая включена в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

Идентичность и/или сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности с применением показателей сходства, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программный пакет GCG включает программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно применять со стандартными параметрами для определения степени гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и расчет процента идентичности последовательности в областях наибольшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000) выше). Последовательности также можно сравнивать с использованием алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием поиска аффинных гэпов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицы BLOSUM 62. Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении представленной в данном документе последовательности с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с применением стандартных параметров. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Антитела к G1TR, содержащие модификации N101 или S103

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения представле-

ны антитела к GITR или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат модификацию N101 или S103 в HCVR. Такая модификация придает раскрываемым антителам требуемые характеристики стабильности *in vitro* и *in vivo*.

Однозначно исключено антитело, представленное в табл. 1 в данном документе и раскрытое в патентном документе США 2017/0355774, в котором отсутствует модификация или мутация N101 или S103 в HCVR.

В некоторых аспектах в данном документе представлены выделенные антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, содержащие модификацию N101 или S103 в HCVR. Антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие такую модификацию, могут дополнительно проявлять одно или более свойств, выбранных из группы, состоящей из следующего:

(a) характеризуется скоростью усечения в сыворотке крови человека, обезьяны или мыши, составляющей менее 0,5% в день; и

(b) характеризуется скоростью усечения *in vivo* у мышей, составляющей приблизительно 0%.

Скорость усечения можно определить, например, посредством анализов, описанных в примерах 2, 5 и 6.

В некоторых аспектах антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 28, 34 и 40; и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10.

В некоторых аспектах антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать аминокислотную последовательность HCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 28, 34 и 40; и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10.

В некоторых аспектах антитело к GITR может содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32, 38 и 44; и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 20.

В некоторых аспектах антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать три CDR тяжелой цепи в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, модифицированной посредством мутации N101A, N101F, N101G, N101H, N101I, N101K, N101L, N101M, N101P, N101Q, N101R, N101V, N101W или N101Y; и три CDR легкой цепи в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. Например, антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать три CDR тяжелой цепи в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, модифицированной посредством мутации N101D, N101E, N101S или N101T; и три CDR легкой цепи в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

В некоторых аспектах антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать три CDR тяжелой цепи в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, модифицированной посредством мутации S103A, S103D, S103E, S103F, S103G, S103H, S103I, S103K, S103L, S103M, S103N, S103P, S103Q, S103R, S103T, S103V, S103W или S103Y; и три CDR легкой цепи в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

Однозначно исключено антитело, представленное в табл. 1 в данном документе и раскрытое в патентном документе США 2017/0355774. Данное антитело не содержит модификацию или мутацию N101 или S103 в HCVR.

Антитела к GITR, включающие Fc-варианты

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения представленные антитела к GITR содержат Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые обеспечивают усиление или ослабление связывания антитела с

FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-области Fc-домена, где мутация(мутации) обеспечивает(обеспечивают) повышение аффинности Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH варьируется от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428, и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S) и также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Объемом настоящего изобретения предусмотрены все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-доме и другие мутации в пределах переменных доменов антитела, раскрытых в данном документе.

Биологические характеристики антител GITR

В настоящем изобретении включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают мономерный человеческий GITR с высокой аффинностью. Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые связывают мономерный человеческий GITR (например, hGITR.mmh) с KD, составляющей менее приблизительно 12,0 нМ, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, с использованием очищенных антител, или по сути аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления представлены антитела к GITR, которые связывают мономерный человеческий GITR при 25°C с KD, составляющей менее приблизительно 12 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ или менее приблизительно 2,0 нМ, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В настоящем изобретении также включены антитела к GITR, которые связывают мономерный человеческий GITR с KD, составляющей менее приблизительно 110 нМ, менее приблизительно 90 нМ, менее приблизительно 70 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 25 нМ или менее приблизительно 15 нМ, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C с использованием формата анализа, представленного в примере 3 в данном документе, при котором антитела секретируются в кондиционированной культуре.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают мономерный человеческий GITR (например, hGITR.mmh) с периодом полудиссоциации ($t^{1/2}$), составляющим более приблизительно 2 минут, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены антитела к GITR, которые связывают мономерный человеческий GITR при 25°C с $t^{1/2}$, составляющим более приблизительно 2 минут, более приблизительно 4 минут, более приблизительно 6 минут, более приблизительно 7 минут или больше, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный человеческий GITR (например, hGITR.mFc) с высокой аффинностью. Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые связывают димерный человеческий GITR с KD, составляющей менее приблизительно 1 нМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, с использованием очищенных антител, или по сути аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены антитела к GITR, которые связывают димерный человеческий GITR при 25°C с KD, составляющей менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 900 пМ, менее приблизительно 800 пМ, менее приблизительно 700 пМ, менее приблизительно 600 пМ, менее приблизительно 500 пМ, менее приблизительно 400 пМ, менее приблизительно 300 пМ, менее приблизительно 200 пМ или менее приблизительно 100 пМ, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, при котором антитела секретируются в кондиционированной культуре.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный человеческий GITR (например, hGITR.mFc) с периодом полудиссоциации ($t^{1/2}$), составляющим более приблизительно 4 минут, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены антитела к GITR, которые связывают димерный человеческий GITR при 25°C с $t^{1/2}$, составляющим более приблизительно 4 минут, более приблизительно 9 минут, более приблизительно 10 минут, более приблизительно 35 минут или более приблизительно 70 минут или дольше, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата ана-

лиза, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают целевые клетки Jurkat/hCD20, экспрессирующие GITR человека или обезьяны. Например, в данном документе представлены антитела, которые связываются с клетками Jurkat/hCD20, экспрессирующими GITR человека или обезьяны, с высокой аффинностью. Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые связывают целевые клетки Jurkat/hCD20, экспрессирующие человеческий GITR, с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 4 нМ, что измерено по средней интенсивности флуоресценции (MFI), например, с применением формата анализа, определенного в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления представлены антитела к GITR, которые связывают целевые клетки Jurkat/hCD20, экспрессирующие GITR человека или обезьяны, с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 4 нМ, менее приблизительно 3 нМ, менее приблизительно 2 нМ, что измерено посредством MFI, например, с применением формата анализа, определенного в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают первичные Т-клетки человека и яванского макака, стимулированные антителом к CD3/антителом к CD28. CD25 и CD69 являются суррогатными маркерами активации первичных Т-клеток человека и яванского макака соответственно. Например, антитела, которые связываются с высокой аффинностью с первичными Т-клетками человека и яванского макака, стимулированными антителом к CD3/антителом к CD28, представлены в данном документе, с применением формата анализа, определенного в примере 8, или по сути аналогичного анализа. В некоторых аспектах антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент можно объединять в комбинацию с ингибитором PD-1, например цемиплимабом. Не ограничиваясь теорией, в присутствии ингибирующей передачи сигналов PD-L1/PD1 цемиплимаб может восстанавливать способность антитела к GITR усиливать активацию Т-клеток, стимулированных антителом к CD3.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые опосредуют активацию NFAT через $Fc\gamma R3a$ человека или яванского макака (Fc -рецептор, который опосредует ADCC и преимущественно экспрессируется на NK-клетках). Например, в данном документе представлены антитела, которые опосредуют активацию NFAT через $Fc\gamma R3a$ человека или яванского макака согласно оценке в биологическом анализе ADCC с использованием репортерного гена. Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые опосредуют активацию NFAT через $Fc\gamma R3a$ человека или яванского макака в биологическом анализе ADCC с использованием репортерного гена с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 32 пМ, что измерено по люминесценции, например, с применением формата анализа, определенного в примере 9 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления представлены антитела к GITR, которые опосредуют активацию NFAT через $Fc\gamma R3a$ человека или яванского макака с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 32 пМ или менее приблизительно 16 пМ, что измерено по люминесценции, например, с применением формата анализа, определенного в примере 9 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

Антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). "Комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису клеток, экспрессирующих антиген, посредством антитела, представленного в данном документе, в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (ADCC) относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc -рецепторы (FcR) (например, натуральные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени, за счет чего осуществляется лизис клетки-мишени. CDC и ADCC могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в уровне техники, (см., например, патенты США № 5500362 и 5821337, а также Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, необходимо ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые опосредуют ADCC. Например, в данном документе представлены антитела, которые опосредуют ADCC в отношении Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR (целевые клетки) в присутствии человеческих первичных NK-клеток (эффекторных клеток). Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые опосредуют ADCC в отношении Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR в присутствии человеческих первичных NK-клеток с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 14 пМ, что измерено по люминесценции, например, с применением формата анализа, определенного в примере 10 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления опосредование ADCC в отношении Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR в присутствии человеческих первичных NK-клеток осуществляется с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 14 пМ, или менее приблизительно 13 пМ, или менее приблизительно 12 пМ, или менее приблизительно 11 пМ, или

менее приблизительно 10 пМ, что измерено по люминесценции, например, с применением формата анализа, определенного в примере 10 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

В другом примере в данном документе представлены антитела, которые опосредуют ADCC в отношении человеческих первичных Т-клеток (целевых клеток) в присутствии человеческих первичных НК-клеток (эффекторных клеток). Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые опосредуют ADCC в отношении человеческих первичных Т-клеток в присутствии человеческих первичных НК-клеток с субнаномолярной EC_{50} , что измерено по люминесценции, например, с применением формата анализа, определенного в примере 11 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые опосредуют ADCP. Например, в данном документе представлены антитела, которые опосредуют зависимость от концентрации ADCP в отношении Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR (целевые клетки) в присутствии человеческих первичных фагоцитов моноцитарного происхождения (эффекторных клеток). Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые опосредуют зависимость от концентрации ADCP в отношении Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR в присутствии человеческих первичных фагоцитов моноцитарного происхождения с субнаномолярной EC_{50} , что измерено по интенсивности зеленой флуоресценции, например, с применением формата анализа, определенного в примере 12 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

В настоящем изобретении также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые усиливают пролиферацию Т-клеток, опосредованную антителом к CD3. Например, в данном документе представлены антитела, которые усиливают пролиферацию первичных $CD4^+$ Т-клеток, опосредованную стимулирующим антителом к CD3, в присутствии вспомогательных клеток НЕК293/Fc γ R2b. Например, в настоящем изобретении включены антитела к GITR, которые усиливают пролиферацию первичных $CD4^+$ Т-клеток, опосредованную стимулирующим антителом к CD3, в присутствии вспомогательных клеток НЕК293/Fc γ R2b с субнаномолярными значениями EC_{50} и с увеличением максимальной пролиферации Т-клеток (измеряемой в СРМ при распаде трития) в 2,3-3,1 раза от фонового значения, например, с применением формата анализа, определенного в примере 13 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

В некоторых аспектах в данном документе представлены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие модификацию N101 или S103 в аминокислотной последовательности HCVR. Антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие такую модификацию, могут дополнительно проявлять одно или более свойств, выбранных из группы, состоящей из следующего:

(а) связывает мономерный человеческий GITR при 25°C с KD, составляющей менее приблизительно 12 нМ, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;

(b) связывает мономерный человеческий GITR при 25°C с $t^{1/2}$, составляющим более приблизительно 2 минут;

(c) связывает димерный человеческий GITR при 25°C с KD, составляющей менее приблизительно 1 нМ, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса; и

(d) связывает димерный человеческий GITR при 25°C с $t^{1/2}$, составляющим более приблизительно 5 минут.

В некоторых аспектах в данном документе представлены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие модификацию N101 или S103 в аминокислотной последовательности HCVR. Антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие такую модификацию, могут дополнительно проявлять одно или более свойств, выбранных из группы, состоящей из следующего:

(а) связывает GITR человека и яванского макака на клеточной поверхности с EC_{50} , составляющей приблизительно 4 нМ;

(b) усиливает Fc-опосредованную активность NFAT в эффекторных клетках Jurkat/NFAT-Luc/hFc γ R3a и/или Jurkat/NFAT-Luc/MfFc γ R3a с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 40 пМ;

(c) опосредует ADCC в отношении человеческих первичных Т-клеток в присутствии человеческих первичных НК-клеток с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 20 пМ;

(d) опосредует ADCP в по меньшей мере приблизительно 5 раз в Т-клетках Jurkat, сконструированных для экспрессии GITR человека или яванского макака, по сравнению с Т-клетками Jurkat, не экспрессирующими GITR;

(e) усиливает пролиферацию первичных $CD4^+$ Т-клеток, опосредованную антителом к CD3;

(f) индуцирует противоопухолевый иммунитет посредством преимущественного истощения внутриопухолевых клеток T_{reg} Fc γ R-зависимым образом и

(g) блокирует связывание человеческого мономерного GITR с лигандом человеческого GITR с IC_{50} , составляющей менее приблизительно 7 нМ.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или более из вышеупомянутых биологических характеристик или любой их комбинацией.

Приведенный выше в данном документе перечень биологических характеристик антител не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут

очевидны специалисту средней квалификации в данной области техники из обзора настоящего изобретения, включая практические примеры из данного документа.

Антитела, которые блокируют связывание GITR с лигандом GITR

В настоящем изобретении включены антитела, которые блокируют связывание лиганда человеческого GITR (hGITRL) с человеческим GITR, что, например, определено в формате анализа, описанном в примере 14 в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в данном документе, блокируют лиганд человеческого GITR (hGITRL). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует лиганд человеческого GITR с процентом блокирования более приблизительно 90% при IC_{50} менее приблизительно 7,0 нМ, что описано в примере 14, или в по сути аналогичном формате анализа. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует лиганд человеческого GITR с процентом блокирования более приблизительно 90%, более приблизительно 95% или более приблизительно 98% при IC_{50} менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 7,0 нМ, менее приблизительно 5,0 нМ или менее приблизительно 3,0 нМ, что описано в примере 14, или в по сути аналогичном формате анализа.

Картирование эпитопов и связанные с ним методики

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в варибельной области молекулы антитела, известной под названием паратоп. Один антиген может содержать более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными участками на антигене и могут проявлять различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован аминокислотами, в пространственном отношении расположенными рядом, из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. При определенных условиях эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп антигена.

Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот белка GITR. В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) GITR. В некоторых вариантах осуществления эпитоп расположен на GITRL-связывающем домене GITR или рядом с ним. В других вариантах осуществления эпитоп расположен за пределами GITRL-связывающего домена GITR, например, в месте на поверхности GITR, в котором антитело при связывании с таким эпитопом не препятствует связыванию GITRL с GITR.

Разные методики, известные специалистам в данной области техники, можно использовать для определения наличия "взаимодействия с одной или более аминокислотами" антитела в пределах полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, например, традиционный анализ перекрестного блокирования, такой как описан в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), аланин-сканирующий мутационный анализ, анализ на основе пептидного блоттинга (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248: 443-463) и анализ пептидного расщепления. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием белка, представляющего интерес, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить осуществление водородно-дейтериевого обмена по всем остаткам, за исключением защищенных антителом остатков (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и анализу посредством масс-спектрометрии, за счет чего выявляют меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A.

В настоящем изобретении дополнительно включены антитела к GITR, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 7 в данном документе). Аналогичным образом, в настоящем изобретении также включены антитела к GITR, которые конкурируют за связывание с GITR с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 7 в данном документе).

Используя стандартные способы, известные из уровня техники и представленные в данном документе в примерах, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и референтное антитело к GITR, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и референтное антитело к GITR, представленное в дан-

ном документе, обеспечивается возможность связывания референтного антитела с белком GITR. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой GITR. Если тестируемое антитело способно связываться с GITR после насыщающего связывания с референтным антителом к GITR, можно сделать вывод о том, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается референтное антитело к GITR. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой GITR после насыщающего связывания с референтным антителом к GITR, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с референтным антителом к GITR, представленным в данном документе. Дополнительные стандартные эксперименты (например, мутации в пептидах и анализы связывания) можно в дальнейшем провести для того, чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено фактом связывания с тем же эпитопом, что и у референтного антитела, или что стерическое блокирование (или другое явление) является ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа можно проводить с применением ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела подавляет связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, что измерено посредством анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела. Считается, что два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только часть аминокислотных мутаций, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с референтным антителом к GITR, описанную выше методика исследования связывания осуществляли в двух направлениях: в первом направлении обеспечивалась возможность связывания референтного антитела с белком GITR в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой GITR. Во втором направлении обеспечивалась возможность связывания тестируемого антитела с молекулой GITR в условиях насыщения с последующей оценкой связывания референтного антитела с молекулой GITR. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно к связыванию с молекулой GITR, то делают заключение, что тестируемое антитело и референтное антитело конкурируют за связывание с GITR. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с референтным антителом, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и референтное антитело, но может стерически блокировать связывание референтного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение человеческих антител

Антитела к GITR по настоящему изобретению могут представлять собой полностью человеческие антитела. Способы получения моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела, известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с человеческим GITR.

Используя, например, технологию VELOCIMMUNE™ или любой другой аналогичный известный способ получения полностью человеческих моноклональных антител, первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к GITR, содержащие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как показано в приведенном ниже экспериментальном разделе, определяют характеристики антител и их подвергают отбору в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, активность блокирования лиганда, селективность, эпитоп и т. д. При необходимости мышинные константные области заменяются требуемой человеческой константной областью, например, из IgG1 или IgG4 дикого типа или из модифицированного IgG1 или IgG4 с получением полностью человеческого антитела к GITR. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, в переменной области сохраняются характеристики связывания с антигеном с высокой аффинностью или специфичности к мишеням. В определенных случаях полностью человеческие антитела к GITR выделяют непосредственно из антиген-положительных В-клеток.

Биологические эквиваленты

Антитела и фрагменты антител к GITR по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать человеческий GITR. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или более из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, однако проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом последовательности ДНК, кодирующие антитело к GITR, по настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одно

или более из добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрываемой последовательностью, но при этом они кодируют антитело к GITR или фрагмент антитела, которые по сути биологически эквивалентны антителу к GITR или фрагменту антитела, раскрытым в данном документе. Примеры таких вариантов аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждались выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологическими эквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень поглощения которых значительно не отличаются при введении одинаковой молярной дозы в сходных экспериментальных условиях в случае либо однократной дозы, либо нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентами по степени их поглощения, но не по скорости их поглощения, и по-прежнему могут считаться биологическими эквивалентами, поскольку такие отличия в скорости поглощения являются предусмотренными и отражены в инструкции по применению лекарственного средства, не являются необходимыми для достижения в организме эффективных концентраций лекарственного средства, например, при длительном применении, и не считаются значимыми в медицинском аспекте в случае конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если отсутствуют клинически значимые отличия в отношении их безопасности, чистоты и активности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если пациента можно перевести один или более раз с референтного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска возникновения побочных эффектов, в том числе значимого с клинической точки зрения изменения иммуногенности, или уменьшения эффективности по сравнению с таковой при продолжении терапии без такого перевода.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия при условии или условиях применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

Биологическую эквивалентность можно продемонстрировать с помощью *in vivo* и *in vitro* способов. Измерения степени биологической эквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в виде зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировал с данными исследования биологической доступности *in vivo* у человека и с достаточной точностью предсказывал их; (c) тест *in vivo* у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в виде зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором определяют безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или биологическую эквивалентность антитела.

Биологически эквивалентные варианты антител к GITR, представленные в данном документе, можно конструировать посредством, например, осуществления различных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антитела к GITR, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например мутации, которые устраняют или исключают гликозилирование.

Видовая селективность и межвидовая перекрестная реактивность

В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены антитела к GITR, которые связываются с человеческим GITR, а не с GITR других видов. В настоящем изобретении также включены антитела к GITR, которые связываются с человеческим GITR и с GITR одного или более видов, отличных от человека. Например, антитела к GITR, представленные в данном документе, могут связываться с человеческим GITR и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или более из GITR мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, игрунки, макака-резуса или шимпанзе. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения представлены антитела к GITR, которые специфически связывают человеческий GITR и GITR яванского макака (например, *Macaca fascicularis*). Другие антитела к GITR, представленные в данном документе, связывают человеческий GITR, но не связывают или связывают, хотя и слабо, GITR яванского макака.

Полиспецифические антитела

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифические антитела могут быть специфичными к разным эпи-

топам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела к GITR по настоящему изобретению могут быть соединены или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально соединены (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или другого способа) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или полиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

В настоящем изобретении включены биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий GITR, а другое плечо иммуноглобулина специфично ко второму антигену. GITR-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления GITR-связывающее плечо связывает человеческий GITR и блокирует связывание GITRL с GITR. В других вариантах осуществления GITR-связывающее плечо связывает человеческий GITR, но не блокирует связывание GITRL с GITR. В некоторых вариантах осуществления GITR-связывающее плечо связывает человеческий GITR и активирует передачу сигналов GITR.

8 других вариантах осуществления GITR-связывающее плечо блокирует стимуляцию рецептора, опосредованную GITRL. В настоящем изобретении также включены биспецифические антитела, где одно плечо антитела связывает первый эпитоп GITR, а другое плечо указанного антитела связывает второй отдельный эпитоп человеческого GITR.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает применение C_H3-домена первого иммуноглобулина (Ig) и C_H3-домена второго Ig, где C_H3-домены первого и второго Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где отличие в по меньшей мере одной аминокислоте ослабляет связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует отличие по аминокислотам. В одном варианте осуществления домен C_H3 первого Ig связывает белок А, а домен C_H3 второго Ig содержит мутацию, которая ослабляет или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов LMGT; H435R согласно нумерации EU). Вторым C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго C_H3 представляют собой следующие: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по LMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (LMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по LMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антитела IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в пределах объема настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диантител, слитые конструкции IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, "выступы-во-впадины", общую легкую цепь (например, общую легкую цепь со структурой "выступы-во-впадины" и т. п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-антитело, "лейциновую застежку", Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab² (для обзора вышеизложенных форматов см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки). Биспецифические антитела также можно конструировать с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, при которой, например, не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью используют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрической формой. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Составление и введение терапевтического препарата

В описании представлены фармацевтические композиции, содержащие антитела к GITR или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции, представленные в данном документе, составляют с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшение переноса, доставки, переносимости и т. п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния), конъюгаты на основе ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера тела пациента, целевого заболевания, патологических состояний, пути введения и т. п. Предпочтительную дозу обычно рассчитывают в соответствии с весом тела или площадью поверхности тела. Для взрослого пациента может быть преимущественным внутривенное введение антитела по настоящему изобретению в норме в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг веса тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту введения и длительность лечения. Эффективные дозировки и схемы введения антител к GITR могут быть определены эмпирически; например, прогресс у пациента можно контролировать путем периодической оценки и соответствующим образом корректировать дозу. Более того, межвидовое приведение дозировок можно выполнить с применением способов, хорошо известных в данной области техники (например, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтических композиций, представленных в данном документе, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, посредством инфузии или болюсного введения, посредством абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные покровы (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и ее можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению с легкостью можно применять устройство для доставки по типу шприца-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприца-ручки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустевал, пустой картридж можно сразу удалить в отходы и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприца-ручки затем можно применять повторно. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприца-ручки сменный картридж отсутствует. Вместо этого одноразовое устройство для доставки по типу шприца-ручки предоставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения резервуара от фармацевтической композиции устройство помещают в отходы целиком.

При подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению используют разнообразные многоразовые устройства для доставки по типу шприца-ручки и автоинъектора. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана, США), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси, США), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки, применяемых для подкожного введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, штат Калифорния, США), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, штат Иллинойс, США), при этом упомянуты лишь несколько из них.

В определенных случаях фармацевтическую композицию можно доставлять в виде системы с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно применять помпу (см. Langer выше; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). В другом варианте осуществления можно применять полимерные материалы; см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени для композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в *Medical Applications of Controlled Release* выше, том 2, ст. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных,

внутрикожных и внутримышечных инъекций, для капельных инфузий и т. п. Эти инъекционные препараты можно получить с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, традиционно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т. п., которые можно применять в комбинации с подходящим солюбилизирующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. п. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т. п., которые можно применять в комбинации с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. п. Полученным таким способом инъекционным составом предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в виде лекарственных форм со стандартной дозой, подобранной таким образом, чтобы она соответствовала дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные составы (ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму со стандартной дозой; в частности, в форме инъекционного состава; для других лекарственных форм предпочтительно, чтобы содержание вышеупомянутого антитела составляло от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг.

Варианты применения антител в терапии

В настоящем изобретении включены способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антитело к GITR (например, антитело к GITR, содержащее любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 7 в данном документе). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител к GITR, их антигенсвязывающих фрагментов или ADC, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела, представленные в данном документе, применимы, помимо всего прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью GITR или опосредованного ими, или поддающихся лечению путем блокирования взаимодействия между GITR и GITRL и/или стимуляции активности GITR и/или передачи сигнала. Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять для лечения иммунных и пролиферативных заболеваний или нарушений, например рака, путем модулирования иммунного ответа, т. е. противоопухолевого ответа, например посредством активации GITR.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, обеспечивают истощение клеток, экспрессирующих высокие уровни GITR, независимо от их способности блокировать лиганд, например посредством ADCC. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять для лечения заболевания или нарушения путем усиления иммунного ответа. В настоящем изобретении включены способы модулирования противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивает повышение соотношения внутриопухолевых эффекторных Т-клеток/регуляторных Т-клеток, что способствует терапевтическому эффекту. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивают усиление истощения внутриопухолевых регуляторных Т-клеток, что способствует терапевтическому эффекту. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивает увеличение соотношения CD8+ Т-клетки/регуляторные Т-клетки, что способствует терапевтическому эффекту. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению способствует выживаемости Т-клеток.

Примеры заболеваний или нарушений, подлежащих лечению посредством антител и антигенсвязывающих фрагментов, включают иммунные и пролиферативные заболевания или нарушения, например рак. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять для лечения первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и мозговых оболочках, ротоглотке, легком и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужском и женском репродуктивных трактах, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кровеносных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, а также специальных органах чувств, таких как глаз. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применяют для лечения солидных или распространяющихся с кровотоком опухолей. В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в дан-

ном документе, применяют для лечения одного или более из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия или рака печени. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака, леченного посредством ICB.

В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения колоректального рака. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC или SCCHN). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака желудка. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака шейки матки. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака пищевода. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения меланомы. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения трижды негативного рака молочной железы. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения почечно-клеточной карциномы. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в данном документе, применимы для лечения аутоиммунного заболевания, в то числе без ограничения очаговой алопеции, аутоиммунного гепатита, глютеновой болезни, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, воспалительного заболевания кишечника, воспалительных миопатий, рассеянного склероза, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, витилиго, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунной крапивницы, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, болезни Крона, сахарного диабета I типа, эозинофильного фасциита, эозинофильного энтерогастрита, синдрома Гудпасчера, миастении гравис, псориазического артрита, ревматической лихорадки, язвенного колита, васкулита и гранулематоза Вегенера.

В контексте способов лечения, описанных в данном документе, антитело к GITR можно вводить в режиме монотерапии (т. е. в качестве единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны в других местах в данном документе).

Средства и составы для комбинированной терапии

В данном документе также представлены средства комбинированной терапии с применением антитела к GITR по настоящему изобретению и любого дополнительного терапевтического средства, которое может быть эффективно объединено в комбинацию с антителом по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом.

В настоящем изобретении включены композиции и терапевтические составы, содержащие любое из описанных в данном документе антител к GITR в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам.

Антитела по настоящему изобретению можно синергически комбинировать с одним или более противоопухолевыми лекарственными средствами или одной или более противоопухолевой терапией, используемых для лечения рака, в том числе, например, в некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в данном документе, применяют для лечения одного или более из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия или рака печени. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака,

ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака, леченного посредством ICB.

В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения колоректального рака. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC или SCCHN). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака желудка. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака шейки матки. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака пищевода. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения меланомы. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения трижды негативного рака молочной железы. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения почечно-клеточной карциномы. В некоторых аспектах антитела по настоящему изобретению применяют для лечения рака молочной железы.

В настоящем документе предусмотрено применение антител к GITR, представленных в данном документе, в комбинации с иммуностимулирующей и/или иммуноподдерживающей терапией для подавления роста опухоли и/или повышения выживаемости пациентов с раком. Варианты иммуностимулирующей терапии включают варианты прямой иммуностимулирующей терапии для усиления активности иммунных клеток путем "ослабления тормоза" в отношении супрессированных иммунных клеток или "давления на газ" для активации иммунного ответа. Примеры включают нацеливание на другие рецепторы контрольных точек иммунного ответа, вакцинацию и адъюванты. Иммуноподдерживающие методы лечения могут повышать антигенность опухоли, способствуя иммуногенной гибели клеток, воспалению или оказывая другие косвенные эффекты, которые способствуют противоопухолевому иммунному ответу. Примеры включают лучевую терапию, химиотерапию, антиангиогенные средства и хирургическое вмешательство.

В настоящем изобретении включены способы модулирования противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела к GITR в комбинации с одним или более агонистическими антителами, направленными против активирующих рецепторов, и одним или более блокирующими антителами, направленными против ингибирующих рецепторов, которые усиливают стимуляцию Т-клеток, что способствует разрушению опухоли.

В настоящем изобретении включены способы модулирования противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, в комбинации с одним или более выделенными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, которые связываются со вторым рецептором, активирующим Т-клетки (т. е. отличным от GITR). В некоторых вариантах осуществления вторым рецептором, активирующим Т-клетки, является CD28, OX40, CD137, CD27 или VEM. В настоящем изобретении также включены составы, содержащие антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают указанный второй рецептор, активирующий Т-клетки.

В различных вариантах осуществления одно или более антител по настоящему изобретению можно применять в комбинации с антителом к PD-L1, антителом к PD-1 (например, ниволумабом, цемиплимабом), ингибитором LAG-3, ингибитором CTLA-4 (например, ипилимумабом), ингибитором TLM3, ингибитором BTLA, ингибитором TIGIT, ингибитором CD47, антагонистом другого коингибитора или лиганда Т-клеток (например, антителом к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонистом фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [например, "ловушкой VEGF", например, афлиберцептом или другим слитым белком, ингибирующим VEGF, изложенным в US 7087411, или антителом к VEGF или его антигенсвязывающим фрагментом (например, бевацизумабом или ранибизумабом), или низкомолекулярным ингибитором киназы рецептора VEGF (например, сунитинибом, сорафенибом или пазопанибом)], ингибитором Ang2 (например, несвакумабом), ингибитором трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотинибом, цетуксимабом), агонистом костимулирующего рецептора (например, агонистом глюкокортикоид-индуцированного белка, родственного TNFR), антителом к опухолеспецифическому антигену (например, CA9, CA125, антигену, ассоциированному с меланомой 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухоль-М2-ПК, простатспецифическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9), вакциной (например, бациллой Кальметта-Герена, противораковой вакциной), адъювантом для повышения презентирования антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором), биспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом к CD3xCD20, биспецифическим антителом к PSMAxCD3), цитотоксином, химиотерапевтическим средством (например, дакарбазином, темозоломидом, циклофосфамидом, доцетакселом, доксорубицином, даунорубицином, цисплатином, карбоплатином, гемцитабином,

метотрексатом, митоксантроном, оксалиплатином, паклитакселом и винкристином), циклофосфамидом, лучевой терапией, ингибитором IL-6R (например, сарилумабом), ингибитором IL-4R (например, дупилумабом), ингибитором IL-10, цитокином, например, IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгатом антителолекарственное средство (ADC) (например, ADC к CD19-DM4 и ADC к DS6-DM4), противовоспалительным лекарственным средством (например, кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), биологически активными пищевыми добавками, например, антиоксидантами или любыми паллиативными средствами для лечения рака. В определенных вариантах осуществления антитела к GITR по настоящему изобретению можно применять в комбинации с противораковыми вакцинами, в том числе вакцинами на основе дендритных клеток, онколитическими вирусами, вакцинами на основе опухолевых клеток и т. д., для увеличения противоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые можно применять в комбинации с антителами к GITR по настоящему изобретению, включают вакцину MAGE3 для меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 для рака молочной железы, EGFRv3 (например, риндопепимук) для рака головного мозга (включая мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (для видов рака CEA+).

В некоторых вариантах осуществления одно или более антител к GITR, описанных в данном документе, вводят в комбинации с одним или более антителами к PD1, включая без ограничения описанные в публикации патента США № 2015/0203579 и в патенте США № 9987500, каждое из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело к GITR представляет собой антитело из патентного документа США 2017/0355774A1, модифицированное так, как это описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD1 представляет собой цемиплимаб, пембролизумаб или ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитела к GITR, представленные в данном документе, можно вводить в комбинации с введением средства лучевой терапии в способах достижения долговременных устойчивых противоопухолевых ответов и/или повышения выживаемости пациентов с раком. В некоторых вариантах осуществления антитела к GITR, представленные в данном документе, можно вводить до, одновременно или после введения средства лучевой терапии пациенту с раком. Например, средство лучевой терапии можно вводить в одной или более дозах для воздействия на опухолевые очаги с последующим введением одной или более доз антител к GITR, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средство лучевой терапии можно вводить локально в опухолевый очаг для усиления локальной иммуногенности опухоли пациента (адьювантное облучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (аблятивное облучение) с последующим системным введением антитела к GITR, представленного в данном документе. Например, средство для внутримозговой лучевой терапии можно вводить пациенту с раком головного мозга (например, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антитела к GITR, представленным в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела к GITR, представленные в данном документе, можно вводить в комбинации со средством лучевой терапии и химиотерапевтическим средством (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом).

В некоторых вариантах осуществления антитела к GITR, представленные в данном документе, можно вводить в комбинации с одним или более противовирусными лекарственными средствами для лечения хронической вирусной инфекции, вызванной LCMV, HIV, HPV, HBV или HCV. Примеры противовирусных лекарственных средств включают без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин и кортикостероиды. В некоторых вариантах осуществления антитела к GITR, представленные в данном документе, можно вводить в комбинации с ингибитором LAG3, ингибитором CTLA-4 или любым антагонистом другого коингибитора T-клеток для лечения хронической вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления антитела к GITR, представленные в данном документе, могут быть объединены в комбинацию с антителом к Fc-рецептору на иммунных клетках с целью лечения аутоиммунного заболевания. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент, представленные в данном документе, вводят в комбинации с антителом или антигенсвязывающим белком, нацеленным на антиген, специфичный для ткани, пораженной аутоиммунным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, вводят в комбинации с антителом или антигенсвязывающим белком, нацеленным на T-клеточный рецептор или B-клеточный рецептор, в том числе без ограничения Fc α (например, CD89), Fc-гамма (например, CD64, CD32, CD16a и CD16b), CD19 и т. д. Антитела или их фрагменты, представленные в данном документе, можно применять в комбинации с любыми лекарственным средством или терапией, известными в данной области техники (например, кортикостероидами и другими иммунодепрессантами), для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, в том числе без ограничения очаговой алопеции, аутоиммунного гепатита, глютенной болезни, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, воспалительного заболевания кишечника, воспалительных миопатий, рассеянного склероза, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, витилиго, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунной крапивницы, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, болезни Крона, сахарного диа-

бета I типа, эозинофильного фасциита, эозинофильного энтерогастрита, синдрома Гудпасчера, миастении гравис, псориазического артрита, ревматической лихорадки, язвенного колита, васкулита и гранулематоза Вегенера.

В настоящем изобретении включены способы модулирования противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, в комбинации с одним или более выделенными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, которые связываются с рецептором, подавляющим Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления рецептор, подавляющий Т-клетки, представляет собой CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA или LAG-3. В настоящем изобретении также включены составы, содержащие антитело к GITR или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывает указанный рецептор, подавляющий Т-клетки. В некоторых аспектах, например в присутствии передачи сигнала PD1, цемиплимаб восстанавливал способность антител к GITR усиливать активацию Т-клеток, стимулированную антителом к CD3.

В настоящем изобретении также включены способы лечения рака путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или состава, описанного в данном документе, субъекту в комбинации с лучевой терапией или химиотерапией.

В некоторых вариантах осуществления антитела к GITR по настоящему изобретению составляют совместно и/или вводят в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из антагониста EGFR (например, антитела к EGFR [например, цетуксимаба или панитумумаба] или низкомолекулярного ингибитора EGFR [например, gefitiniba или эрлотиниба]), антагониста другого представителя семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антитела к ErbB2 [например, трастузумаба или T-DM1 {KADCYLA®}], антитела к ErbB3, или антитела к ErbB4, или низкомолекулярного ингибитора активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагониста EGFRvIII (например, антитела, которое специфически связывает EGFRvIII), антагониста cMET (например, антитела к cMET), антагониста IGF1R (например, антитела к IGF1R), ингибитора B-raf (например, вемурафениба, сорафениба, GDC-0879, PLX-4720), ингибитора PDGFR- α (например, антитела к PDGFR- α), ингибитора PDGFR- β (например, антитела к PDGFR- β или низкомолекулярного ингибитора киназ, такого как, например, иматиниба мезилата или сунитиниба малата), ингибитора лиганда PDGF (например, антитела к PDGF-A, -B, -C или -D, аптамера, миРНК и т. д.), антагониста VEGF (например, VEGF-ловушки, как, например, афлиберцепта, см., например, патент США 7087411 (также упоминаемого в данном документе под названием "слитый белок, ингибирующий VEGF"), антитела к VEGF (например, бевацизумаба), низкомолекулярного киназного ингибитора рецептора VEGF (например, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)), антагониста DLL4 (например, антитела к DLL4, раскрытого в патентном документе США 2009/0142354, такого как REGN421), антагониста Ang2 (например, антитела к Ang2, раскрытого в патентном документе США 2011/0027286, например, H1H685P), антагониста FOLH1 (например, антитела к FOLH1), антагониста STEAP1 или STEAP2 (например, антитела к STEAP1 или антитела к STEAP2), антагониста Tmprss2 (например, антитела к Tmprss2), антагониста MSLN (например, антитела к MSLN), антагониста CA9 (например, антитела к CA9), антагониста уроплакина (например, антитела к уроплакину [например, антитела к UPK3A]), антагониста MUC16 (например, антитела к MUC16), антагониста антигена Tn (например, антитела к Tn), антагониста CLEC12A (например, антитела к CLEC12A), антагониста TNFRSF17 (например, антитела к TNFRSF17), антагониста LGR5 (например, антитела к LGR5), моновалентного антагониста CD20 (например, моновалентного антитела к CD20, например, ритуксимаба) и т. д. Другие средства для предпочтительного введения в комбинации с антителами, представленными в данном документе, включают, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами.

В настоящем изобретении включены композиции и терапевтические составы, содержащие любое из антител к GITR, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более химиотерапевтическими средствами. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytoxan™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилендиофосфорамида и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как акладиномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родоруби-

цин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностаин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калуостерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средство для восполнения фолиевой кислоты, такое как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин;

подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепу; таксаны, например, паклитаксел (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доцетаксел (Taxotere™; Aventis Antony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. В данное определение также включены антигормональные средства, которые регулируют или подавляют воздействие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

Антитела к GITR, представленные в данном документе, также можно вводить и/или составлять в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами COX, кардиопротекторами, хелаторами металлов, IFN-гамма и/или NSAID.

Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы), например, любое из перечисленных выше средств или их производных, можно вводить непосредственно перед антителом к GITR по настоящему изобретению, одновременно с ним или вскоре после его введения (для целей настоящего изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антитела к GITR "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом). В настоящем изобретении включены фармацевтические композиции, в которых антитело к GITR по настоящему изобретению составляют вместе с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, описанными в других местах в данном документе.

Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту до введения антитела к GITR по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 часа до, за 60 часов до, за 48 часов до, за 36 часов до, за 24 часа до, за 12 часов до, за 6 часов до, за 5 часов до, за 4 часа до, за 3 часа до, за 2 часа до, за 1 час до, за 30 минут до, за 15 минут до, за 10 минут до, за 5 минут до или менее чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела к GITR по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, через 5 минут после, через 10 минут после, через 15 минут после, через 30 минут после, через 1 час после, через 2 часа после, через 3 часа после, через 4 часа после, через 5 часов после, через 6 часов после, через 12 часов после, через 24 часа после, через 36 часов после, через 48 часов после, через 60 часов после или через 72 часа после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к GITR по настоящему изобретению. "Одновременное" введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение субъекту антитела к GITR и дополнительного терапевтически активного компонента в единичной лекарственной форме (например, составленные вместе) или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 минут или меньше относительно друг друга. При введении в виде отдельных лекарственных форм каждую лекарственную форму можно вводить посредством одного и того же пути (например, как антитело к GITR, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно, подкожно и т. д.); в качестве альтернативы каждую лекарственную форму можно вводить посредством разных путей (например, антитело к GITR мож-

но вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить подкожно). В любом случае все способы введения компонентов в единичной лекарственной форме, в раздельных лекарственных формах посредством одного и того же пути или в виде раздельных лекарственных форм посредством разных путей введения считаются "одновременным введением" для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения введение антитела к GITR "до", "одновременно" или "после" (согласно определениям данных терминов в данном документе, приведенным выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антитела к GITR "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

В настоящем изобретении включены фармацевтические композиции, в которых антитело к GITR по настоящему изобретению составляют вместе с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, описанными в других местах в данном документе, с использованием разных комбинаций дозировок.

В иллюстративных вариантах осуществления, в которых антитело к GITR, представленное в данном документе, вводят в комбинации с антагонистом VEGF (например, VEGF-ловушкой, например, афлиберцептом), в том числе введение совместных составов, содержащих антитело к GITR и антагонист VEGF, отдельные компоненты могут быть введены субъекту и/или составлены совместно с применением различных комбинаций дозировок. Например, антитело к GITR можно вводить субъекту и/или оно может содержаться в совместном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01 мг, 0,02 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг, 5,0 мг, 6,0 мг, 7,0 мг, 8,0 мг, 9,0 мг и 10,0 мг; и антагонист VEGF (например, VEGF-ловушку, например, афлиберцепт) можно вводить субъекту и/или содержать в совместном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,1 мг, 1,2 мг, 1,3 мг, 1,4 мг, 1,5 мг, 1,6 мг, 1,7 мг, 1,8 мг, 1,9 мг, 2,0 мг, 2,1 мг, 2,2 мг, 2,3 мг, 2,4 мг, 2,5 мг, 2,6 мг, 2,7 мг, 2,8 мг, 2,9 мг и 3,0 мг. Комбинации/совместные составы можно вводить субъекту в соответствии с любой из схем введения, раскрытых в других местах данного документа, в том числе, например, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев и т. д.

Схемы введения

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения несколько доз антитела к GITR (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к GITR и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту, представленному в данном документе, включают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к GITR, описанного в данном документе. Используемое в данном документе выражение "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к GITR вводят субъекту в отдельный момент времени, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). В настоящем изобретении включены способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к GITR, затем одной или более вторичных доз антитела к GITR, и затем необязательно одной или более третичных доз антитела к GITR.

Выражения "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к GITR, представленного в данном документе. Соответственно, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называется "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальной, вторичной и третичной доз могут содержать одинаковое количество антитела к GITR, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако в определенных вариантах осуществления количество антитела к GITR, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, при необходимости корректируется в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в качестве "нагрузочных доз", затем последующие дозы вводят с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или больше) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает в контексте последовательности из нескольких введений дозу антитела к GITR, которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных введений доз.

Способы в соответствии с данным аспектом, представленным в данном документе, могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела к GITR. Например, в

определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) вторичных доз. Аналогично в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичных доз. Схему введения можно использовать в течение неопределенного срока на протяжении жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение не утратит терапевтическую необходимость или преимущество.

В вариантах осуществления, включающих несколько вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели или 1-2 месяца после введения непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом в вариантах осуществления, включающих несколько третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-12 недели после введения непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления, представленных в данном документе, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьироваться на протяжении схемы лечения. Врач может корректировать частоту введения в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

В настоящем изобретении включены схемы введения, при которых пациенту вводят от 2 до 6 "нагрузочных" доз с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т. д.) с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз с меньшей частотой. Например, согласно этому аспекту, представленному в данном документе, если "нагрузочные" дозы вводят с частотой один раз в месяц, тогда поддерживающие дозы можно вводить пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца и т. д.

Варианты применения антител в диагностике

Антитела к GITR по настоящему изобретению также можно применять для обнаружения и/или измерения содержания GITR или клеток, экспрессирующих GITR, в образце, например для диагностических целей. Например, антитело к GITR или его фрагмент можно применять для диагностики патологического состояния или заболевания, характеризующихся отклоняющейся от нормы экспрессией GITR (например, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т. д.). Иллюстративные диагностические анализы на GITR могут предусматривать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с антителом к GITR, представленным в данном документе, при этом антитело к GITR мечено поддающейся обнаружению меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы немеченое антитело к GITR можно применять в диагностических вариантах применения в комбинации со вторичным антителом, которое само является меченым с обеспечением обнаружения. Выявляемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I , флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеин или родамин, или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для выявления или измерения содержания GITR в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), иммуно-PET (например, ^{89}Zr , ^{64}Cu и т. д.) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах на GITR в соответствии с настоящим изобретением, включают образец любой ткани или жидкости, который можно получить от пациента и который содержит поддающиеся обнаружению количества белка GITR или его фрагментов в нормальном или патологическом состояниях. Обычно для первоначального определения исходного или стандартного уровня GITR будут измерять уровни GITR в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или патологическим состоянием, ассоциированными с аномальными уровнями или активностью GITR). Этот исходный уровень GITR затем можно сравнивать с уровнями GITR, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие заболевания или патологического состояния, связанных с GITR.

Примеры

Следующие примеры представлены с тем, чтобы обеспечить специалистов средней квалификации в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции, представленные в данном документе, и они не предполагают ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количеству, температуре и т. п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Получение антител к GITR

Антитела к GITR получали посредством иммунизации мыши VELOCLMMUNE® (т. е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи человеческого иммуноглобулина) иммуногеном, содержащим растворимый димерный эктодомен человеческого GITR. Мониторинг гуморального иммунного ответа осуществляли с помощью GITR-специфического иммуноанализа. Несколько полностью человеческих антител к GITR выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как это описано в патентном документе США 2007/0280945A1.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранного антитела к GITR, антитела CompAb1 согласно ранее раскрытому в патентном документе США2017/0355774A1. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 2. В табл. 3 представлены полноразмерные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела CompAb1.

Таблица 1
Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CompAb1	2	4	6	8	10	12	14	16

Таблица 2
Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CompAb1	1	3	5	7	9	11	13	15

Таблица 3
Полноразмерные последовательности тяжелых и легких цепей

	SEQ ID NO:			
Обозначение антитела	Полноразмерная тяжелая цепь		Полноразмерная легкая цепь	
	Нуклеиновая кислота	Аминокислота	Нуклеиновая кислота	Аминокислота
CompAb1	17	19	19	20

Пример 2. Оценка и количественный учет усечений в антителе к GITR, CompAb1

При определении характеристик антитела CompAb1 было обнаружено, что часть расщеплялась в ходе экспрессии белка. Следующий анализ выполняли для определения точки, в которой происходило усечение, и для определения количества антител, подвергшихся усечению.

Образцы антитела CompAb1 анализировали посредством анализа масс исходного вещества с использованием обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с УФ-детектором и встроенным масс-спектрометром Waters Vion IMS QToF для определения молекулярной массы антитела и его вариантов. Каждый образец антитела вводили в колонку Waters ACQUITY UPLC BEH300 C4 (1,7 мкм, 2,1 мм×50 мм), уравновешенную 99% подвижной фазы А (0,1% муравьиной кислоты в воде Milli-Q) и 1% подвижной фазы В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле) перед введением образца. Температуру колонки поддерживали при 80°C. Белки элюировали с использованием системы Waters ACQUITY UPLC со скоростью потока 0,25 мл/мин. После введения образца общий градиент подвижной фазы поддерживали на уровне 1% подвижной фазы В в течение первых 3 минут, после чего следовало линейное увеличение от 1% до 20% подвижной фазы В в течение 2 минут, второе линейное увеличение с 20% до 35% подвижной фазы В в течение 15 минут, и затем третье линейное увеличение от 35% до 70% подвижной фазы В в течение 5 минут с завершающим увеличением до 90% подвижной фазы В в течение следующих 2 минут. Профиль элюирования для элюированного белка отслеживали при 215 нм с использованием матричного фотодиодного детектора, а массу элюированного белка измеряли с использованием масс-спектрометра Waters Vion IMS QToF.

Используя этот процесс, идентифицировали усеченный вариант полноразмерного антитела

CompAb1 к GITR. Усеченная форма антитела элюировалась раньше, чем полноразмерное антитело на УФ-хроматограмме. Масса усеченной формы соответствовала расщеплению между остатками N¹⁰¹ и P¹⁰² в области CDR3 тяжелой цепи CompAb1. Содержание усеченной формы оценивается в примерно 5% от общего количества антител исходя из площади пика УФ-хроматограммы для нескольких партий CompAb1. Расположение данных расщеплений подтверждали с помощью анализа методом пептидного картирования с восстановлением, где CompAb1 расщепляли до пептидов с лизином или аргинином на конце с использованием трипсина и анализировали посредством LC-разделения с обращенной фазой с последующей масс-спектрометрией на масс-спектрометре Q Exactive. Триптические пептиды, соответствующие полноразмерному антителу, а также более короткие пептиды с N¹⁰¹ и P¹⁰² на конце, соответствующие сайту усечения в CDR3, идентифицировали на основании их точных масс и спектров фрагментации.

Уровни усечения в CompAb1 возрастают со временем в сыворотке крови *in vitro* и *in vivo*

CompAb1 инкубировали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) и сыворотке крови обезьяны при 37°C в течение до 28 дней для исследования стабильности CompAb1 в физиологических условиях *in vitro*. Кроме того, мышам вводили CompAb1 в дозе 10 мг/кг и отбирали сыворотку крови через 1 и 8 дней для исследования стабильности CompAb1 *in vivo*.

CompAb1 выделяли из образцов сыворотки крови с применением магнитных гранул, покрытых антителом к Fc человека. Очищенный CompAb1 элюировали из гранул в кислых условиях, а затем расщепляли с использованием фермента Lys-C, который разрезал полноразмерное антитело на пептиды с лизином на конце. Образцы разделяли с использованием обращенно-фазовой LC в режиме градиентного элюирования и анализировали посредством масс-спектрометра Q Exactive HF. Пептиды, получаемые посредством обработки с использованием Lys-C, соответствующие полноразмерному антителу и антителу, усеченному по N¹⁰¹/P¹⁰², идентифицировали во всех образцах на основании их точных масс-спектров и спектров фрагментации. Площади пиков на хроматограмме экстрагированных ионов, соответствующие массе интактного и усеченного антитела, использовали для расчета процента усечения в каждом образце.

Результаты показали, что инкубация в PBS приводила к увеличению усечения CompAb1 с 10,3% до 24,5% в течение 28 дней, а инкубация в сыворотке крови обезьян приводила к увеличению того же усечения CompAb1 с 7,4% до 48,7% в течение 28 дней (фиг. 1). Уровень усечения CompAb1 в сыворотке крови мышей, получавших дозу, возрос с начального уровня 7,7% до 54% через 8 дней (фиг. 2).

Пример 3. Получение вариантов по тяжелой цепи антитела CompAb1 к GITR, которые сохраняют связывание с GITR

Выполняли скрининг для выявления вариантов по тяжелой цепи (НС) CompAb1, которые предупреждают усечение по аминокислотам ¹⁰¹NP¹⁰² или ¹⁰²PS¹⁰³ в CDR3, сохраняя при этом функциональность в отношении GITR. Фрагменты двухнитевой ДНК, представляющие варианты переменного домена тяжелой цепи (НС) CompAb1, упорядочивали и синтезировали с помощью IDT (gBlock Gene Fragments), а затем клонировали в вектор экспрессии, содержащий константную область тяжелой цепи человеческого IgG1. Всего было получено 36 вариантов путем замены N101 или S103 НС CompAb1 всеми аминокислотами за исключением цистеина. См. табл. 4.

Антитела получали после кратковременной экспрессии каждого варианта по НС и легкой цепи CompAb1 (универсальная легкая цепь 1-39 зародышевой линии) в клетках CHO.

Таблица 4
Варианты CompAb1 по тяжелой цепи

Номер образца	Вариант по HC	Легкая цепь (ULC 1-39 зародышевой линии)
1	WT	WT
2	N101A	WT
3	N101D	WT
4	N101E	WT
5	N101F	WT
6	N101G	WT
7	N101H	WT
8	N101I	WT
9	N101K	WT
10	N101L	WT
11	N101M	WT
12	N101P	WT
13	N101Q	WT
14	N101R	WT
15	N101S	WT
16	N101T	WT
17	N101V	WT
18	N101W	WT
19	N101Y	WT
20	S103A	WT
21	S103D	WT
22	S103E	WT
23	S103F	WT
24	S103G	WT
25	S103H	WT
26	S103I	WT
27	S103K	WT
28	S103L	WT
29	S103M	WT
30	S103N	WT
31	S103P	WT
32	S103Q	WT
33	S103R	WT
34	S103T	WT
35	S103V	WT
36	S103W	WT
37	S103Y	WT

Супернатанты, содержащие антитела, собирали и отправляли для скрининга при помощи Вiasоге для измерения связывания с GITR.

Аффинность связывания и кинетические константы антител к человеческому GITR определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса.

Анализ антител, секретируемых в кондиционированной культуральной среде, с использованием Вiasоге выполняли следующим образом. Используя прибор Вiasоге 2000 при 25°C, осуществляли захват антител в течение 80 секунд при скорости потока 8 мкл/мин на поверхности CM5, связанной с Fc человека. Было захвачено примерно 1000-2000 RU каждого антитела. 100 нМ hGITR.mmH (растворимый мономерный hGITR, SEQ ID NO: 45) или 50 нМ hGITR.mFc (димерный GITR *Macaca fascicularis*, SEQ ID NO: 46) наносили на эту поверхность в течение 2 минут при скорости потока 50 мкл/мин. Диссоциацию измеряли в течение 2 минут. K_D и $t_{1/2}$ рассчитывали путем подгонки сенсограмм с двумя контрольными источниками к модели связывания 1:1.

Таблица 5
Аффинности связывания, определенные с использованием Вiasоге: супернатанты CHOt

Номер образца	Вариант по HC	hGITR.mmH		hGITR.mFc	
		K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
1	WT	2,49E-08	4,56	2,01E-10	194,05
2	N101A	NB	NB	4,24E-08	0,47

3	N101D	1,48E-08	7,52	8,13E-11	344,98
4	N101E	1,09E-07	0,99	1,27E-09	34,90
5	N101F	NB	NB	NB	NB
6	N101G	IC	IC	IC	IC
7	N101H	NB	NB	NB	NB
8	N101I	3,29E-07	1,32	2,75E-08	0,72
9	N101K	1,70E-08	4,91	2,69E-08	0,99
10	N101L	NB	NB	5,75E-08	0,45
11	N101M	1,52E-07	1,93	2,40E-08	0,82
12	N101P	NB	NB	NB	NB
13	N101Q	3,41E-09	16,70	9,98E-09	3,86
14	N101R	IC	IC	2,94E-08	0,86
15	N101S	8,19E-08	0,92	9,08E-10	37,73
16	N101T	6,13E-08	1,52	2,84E-10	109,58
17	N101V	2,91E-08	3,46	2,39E-08	0,98
18	N101W	NB	NB	NB	NB
19	N101Y	NB	NB	NB	NB
20	S103A	1,08E-07	0,83	5,29E-10	50,28
21	S103D	7,71E-08	1,01	5,95E-10	65,00
22	S103E	1,19E-07	0,76	7,42E-10	42,43
23	S103F	7,35E-09	13,61	2,33E-09	12,84
24	S103G	IC	IC	5,56E-09	7,40
25	S103H	1,26E-08	16,45	6,68E-09	4,63
26	S103I	1,01E-08	11,49	6,51E-09	4,41
27	S103K	NB	NB	4,75E-08	0,64
28	S103L	8,52E-08	4,59	1,59E-08	1,66
29	S103M	4,62E-09	15,21	1,04E-09	27,30
30	S103N	1,19E-07	0,95	1,01E-09	41,43
31	S103P	2,84E-08	11,18	7,79E-09	2,92
32	S103Q	9,68E-08	0,92	2,55E-10	123,85
33	S103R	NB	NB	4,56E-08	0,75
34	S103T	2,96E-08	3,88	1,27E-10	248,92
35	S103V	7,39E-09	14,70	3,82E-09	7,80
36	S103W	1,16E-07	0,94	1,61E-09	27,03
37	S103Y	4,39E-09	26,65	3,03E-09	10,41

NB: в используемых условиях связывание не обнаруживали. IC: неубедительные данные.

Результаты, полученные посредством Biacore для супернатантов CHOt, позволяют сделать предположение, что по меньшей мере четыре варианта hC (N101D, N101E, N101S и N101T) сохраняют аналогичное связывание с мономерным (hGITR.mmh) и димерным (hGITR.mFc) GITR по сравнению с CompAb1. См. табл. 5.

Примечательно, что многие варианты утратили связывание GITR по сравнению со связыванием GITR исходным антителом. Из вариантов-кандидатов N101, которые сохраняли сходное связывание с GITR по сравнению с CompAb1, четыре отобрали для дальнейшего определения характеристик. Эти варианты получали в CHO-стабильной (CHOs) клеточной линии и в дальнейшем очищали.

Анализ очищенных антител с использованием Biacore выполняли следующим образом. С помощью прибора Biacore T-200 осуществляли захват антител в течение 30 секунд при скорости потока 8 мкл/мин на поверхности CM5, связанной с Fc человека. Было захвачено примерно 120 RU каждого антитела. 10 нМ hGITR.mmh (растворимый мономерный hGITR, SEQ ID NO: 45) или 5 нМ hGITR.mFc (димерный GITR *Mascas fascicularis*, SEQ ID NO: 46) наносили на эту поверхность в течение 5 минут при скорости потока 50 мкл/мин. Диссоциацию измеряли в течение 10 мин. K_D и $t_{1/2}$ рассчитывали путем подгонки сенсограмм с двумя контрольными источниками к модели связывания 1:1.

K_D и $t_{1/2}$ четырех очищенных вариантов N101 для мономерного (hGITR.mmh) и димерного (hGITR.mFc) GITR по сравнению с CompAb1 показаны в табл. 6.

Таблица 6

Аффинности связывания вариантов, полученных при помощи клеток CHO, определенные с использованием Biacore

mAb к GITR	Идентификатор	hGITR.mmh		hGITR.mFc	
		KD (M)	t1/2 (мин)	KD (M)	t1/2 (мин)
CompAb1	CompAb1	1,51E-09	6,75	1,37E-10	35,57
Вариант N101D	mAb1	1,18E-09	7,58	1,04E-10	71,74
Вариант N101E	mAb2	1,13E-08	2,80	9,02E-10	9,55
Вариант N101S	mAb3	6,05E-09	4,65	8,82E-10	5,56
Вариант N101T	mAb4	8,00E-09	2,25	6,63E-10	10,03

Пример 4. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот переменных областей тяжелой и легкой цепей

В табл. 7 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR вариантов антитела CompAb1, представляющего собой антитело к GITR. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 8.

Таблица 7
Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb1	22	4	6	24	10	12	14	16
mAb2	28	4	6	30	10	12	14	16
mAb3	34	4	6	36	10	12	14	16
mAb4	40	4	6	42	10	12	14	16

Таблица 8
Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb1	21	3	5	23	9	11	13	15
mAb2	27	3	5	29	9	11	13	15
mAb3	33	3	5	35	9	11	13	15
mAb4	39	3	5	41	9	11	13	15

Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что антитело, содержащее антитело с Fc конкретного изоформа, можно превращать в антитело, содержащее Fc другого изоформа, но в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 7 и 8, останутся такими же, и при этом ожидается, что свойства связывания будут идентичными или по сути сходными независимо от природы Fc-домена.

В табл. 9 представлены иллюстративные идентификаторы полноразмерных нуклеиновых кислот тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) и аминокислотной последовательности для выбранных антител к GITR.

Таблица 9
Идентификаторы последовательностей для полноразмерных последовательностей тяжелой и легкой цепей иллюстративных антител к GITR

Обозначение антитела	SEQ ID NO:			
	Полноразмерная тяжелая цепь		Полноразмерная легкая цепь	
	Нуклеиновая кислота	Аминокислота	Нуклеиновая кислота	Аминокислота
mAb1	25	26	19	20
mAb2	31	32	19	20
mAb3	37	38	19	20
mAb4	43	44	19	20

Пример 5. Оценка и количественное определение усечений в вариантах антитела CompAb1 к GITR

Как описано выше, идентифицировали усеченный вариант полноразмерного антитела CompAb1 к GITR. Масса усеченной формы соответствовала расщеплению между остатками N¹⁰¹ и P¹⁰² в области CDR3 тяжелой цепи CompAb1. Далее конструировали новые варианты антител с заменой одной аминокислоты в положении N¹⁰¹ сайта усечения N¹⁰¹/P¹⁰² в CompAb1. Эти новые варианты антител анализировали для того, чтобы подтвердить их идентичность и определить, демонстрируют ли новые варианты усечение.

Денатурирующую SEC (которую осуществляют при низкой температуре и мягком pH) использовали для анализа варианта с усечением. CompAb1 и mAb1 разбавляли до 1 мг/мл и 5 мкг каждого образца вводили в колонку Waters ACQUITY UPLC BEH200 SEC (1,7 мкм, 4,6 мм × 300 мм). Колонку уравновешивали 100% подвижной фазы А (30% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты, 0,1% трифторуксусной кислоты в воде Milli-Q) перед введением образца. Подогрев колонки отключили. Белки элюировали изократически, используя систему Waters ACQUITY UPLC при 100% подвижной фазе А со скоростью потока 0,10 мл/мин в течение 5 минут.

Анализ интактного антитела посредством денатурирующей SEC-MS без нагревания колонки показал отсутствие усечения mAb1 и mAb2 (табл. 10). Эти результаты подтвердились после того, как варианты проанализировали посредством анализа методом пептидного картирования с восстановлением и LC-MS (данные не показаны).

Таблица 10
Процент усечения, измеренный у вариантов CompAb1 и N¹⁰¹

Название образца	Вариант	Процент усечения (%), полученный посредством SEC-MS
CompAb1	N/A	3,7
mAb1	N101D	0
mAb2	N101E	0
mAb3	N101S	NA
mAb4	N101T	NA

NA: не анализировали.

Пример 6. Согласно данным анализа стабильности в сыворотке крови в вариантах N101D и N101E CompAb1 усечение не выявлено

CompAb1 и варианты-кандидаты, которые по результатам анализа посредством Вiasoge были наиболее схожими с исходным кандидатом в плане связывания с человеческим белком GITR, mAb1 (N101D) и mAb2 (N101E) (см. предыдущий пример), инкубировали в сыворотке крови человека, обедненной по IgG, и мышинной сыворотке крови, и буфере HEPES при 37°C для проверки их стабильности в физиологических условиях. Кроме того, мышам вводили дозы CompAb1, mAb1 и mAb2 (10 мг/кг) и отбирали сыворотку крови через 4 часа, 1, 2, 4 и 8 дней. Антитела аффинно очищали посредством соосаждения с антителом к Fc и расщепляли с использованием Lys-C. В способе расщепления с использованием Lys-C и LC-MS использовали только низкие температуры для денатурации антител и низкие температуры колонки для предупреждения искусственного усечения варианта N101D. Уровни усечения в молекуле CompAb1 после инкубации с сывороткой крови возрастали, но в mAb1 или mAb2 усечения на протяжении всего периода времени не обнаруживали (фиг. 3 и фиг. 4). Аналогичным образом усечение обнаруживали при различных уровнях в CompAb1, введенном мышам, но не в вариантах mAb1 или mAb2. См. табл. 11.

Таблица 11
Стабильность mAb1 и mAb2 in vitro и in vivo

Стабильность антитела		CompAb1	mAb1 (N101D)	mAb2 (N101E)
Анализ		% усечения	% усечения	% усечения
Инкубация с сывороткой крови in vitro	Человек	N-концевой фрагмент: (T = 0): 5,2%; (T = 14): 15,0% Скорость: 0,7%/день С-концевой фрагмент:	Не обнаружено	Не обнаружено
		(T = 0): 16,7%; (T = 14): 45,0% Скорость: 1,9%/день		
	Мышь	N-концевой фрагмент: (T = 0): 5,0%; (T = 16): 33,0% Скорость: 1,8%/день С-концевой фрагмент: (T = 0): 22,0%; (T = 16): 50% Скорость: 1,7%/день	Не обнаружено	Не обнаружено
Стабильность in vivo	Мышь	Выявлены варьирующие уровни усечения	Не обнаружено	Не обнаружено

Пример 7. Связывание антитела к GITR с GITR на клеточной поверхности

Для оценки связывания mAb1 с клетками Jurkat/hCD20/hGITR и клетками Jurkat/hCD20/MfGITR использовали проточную цитометрию. Клетки Jurkat/hCD20 использовали в качестве клеточной линии отрицательного контроля для связывания GITR. Клетки добавляли в 96-луночный планшет с V-образным дном (от 2×10^5 до 4×10^5 клеток/луночка) и инкубировали в Fc-блокирующем растворе с последующей по-

следовательной инкубацией на льду с первичным антителом (mAb1 или изотипическим контролем IgG1) в конечных концентрациях в диапазоне от 18 пМ до 300 нМ и вторичным антителом (AF647-конъюгированное к IgG человека) в концентрации 5 мкг/мл. Затем клетки окрашивали красителем LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain в соответствии с инструкциями производителя. Клетки фиксировали с использованием BD Cytofix и фильтровали через фильтровальный планшет AcroPrep Advance перед анализом на проточном цитометре Intellicyt iQue Screener PLUS. Данные анализировали посредством программного обеспечения FlowJo. Для определения EC₅₀ (эффективная концентрация при 50% активности) измеренные геометрические значения MFI анализировали с применением 4-параметрического логистического уравнения по 9-точечной кривой ответа с помощью GraphPad Prism. Кратность связывания определяли, взяв соотношение наивысшей MFI на кривой и MFI лунок, содержащих только вторичное антитело.

mAb1 продемонстрировало зависимое от концентрации связывание с клетками Jurkat/hCD20, сконструированными для экспрессии клеток hG1TR или MfG1TR со значениями EC₅₀ в наномолярном диапазоне; связывание с клетками Jurkat/hCD20 не выявили (фиг. 5). Изотипический контроль IgG1 не показал связывания ни с одной из 3 исследованных клеточных линий. Для mAb1 и изотипического контроля IgG1 регистрировали значения EC₅₀ (там, где применимо), максимальную MFI (наивысшая средняя MFI в пределах исследуемого диапазона доз) и кратность связывания, рассчитанную как максимальная MFI выше фонового значения (только вторичное антитело). Результаты обобщены в табл. 12.

Таблица 12

Связывание антитела с Т-клетками Jurkat, сконструированными для экспрессии G1TR человека или яванского макака

Антитело	Jurkat/hCD20			Jurkat/hCD20/hG1TR			Jurkat/hCD20/MfG1TR		
	Макс. MFI ^a	Кратность связывания ^b	EC ₅₀ (М)	Макс. MFI ^a	Кратность связывания ^b	EC ₅₀ (М)	Макс. MFI ^a	Кратность связывания ^b	EC ₅₀ (М)
mAb1	980	1,06	ND	28900 3	290	1,96E-09	342865	277	3,52E-09
Изотип. контроль IgG1	1071	1,15	ND	1090	1,09	ND	1361	1,10	ND

^a Максимальная MFI представляла собой наивысшее среднее значение MFI в диапазоне исследованных концентраций (от 18 пМ до 300 нМ).

^b Кратность связывания рассчитывали как максимальную MFI выше фонового значения (только вторичное антитело).

h: человек; Mf: *Maca fascicularis* (яванский макака); ND: не определено, поскольку не наблюдали связывание, зависимое от концентрации.

Таким образом, mAb1 продемонстрировало зависимое от концентрации связывание с целевыми клетками Jurkat/hCD20, экспрессирующими G1TR человека или обезьяны, с аналогичной эффективностью (EC₅₀) и максимальной кратностью связывания.

Пример 8. Связывание антитела к G1TR с активированными первичными Т-клетками человека и яванского макака

В данном эксперименте оценивали связывание mAb1 с первичными Т-клетками человека и яванского макака, стимулированными антителом к CD3/антителом к CD28. CD25 и CD69 представляли собой суррогатные маркеры активации первичных Т-клеток человека и яванского макака соответственно.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из цельной крови человека или яванского макака (по 4 донора) с использованием центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS в пробирках SepMate (для PBMC человека) или конических пробирках объемом 50 мл (для PBMC яванского макака) и переносили в свежую коническую пробирку для инкубации в буфере для лизиса эритроцитов (RBC). Затем PBMC промывали и переносили в колбу для культивирования T75 для активации и размножения Т-клеток с применением набора для активации/размножения Т-клеток человека или примата, отличного от человека. Через 4 дня активирующие гранулы удаляли из культуры с использованием сепаратора MACSiMAG, клетки собирали и подсчитывали.

Для оценки связывания mAb1 с Т-клетками человека или яванского макака в активированных PBMC использовали проточную цитометрию. Клетки добавляли в 96-луночный планшет с V-образным дном (3×10^5 клеток/луночка) и инкубировали в растворе для блокирования Fc/блокирования моноцитов с последующей инкубацией на льду со смесью для фенотипирования Т-клеток, состоящей из антител, конъюгированных с флуорофором (антитело к CD3, антитело к CD4, антитело к CD8 и антитело к CD25 [маркер активации человеческих Т-клеток] или антитело к CD69 [маркер активации Т-клеток яванского макака]), mAb1, конъюгированного с AF647, или изотипического контроля IgG1, конъюгированного с AF647 (конечные концентрации в диапазоне от 8 пМ до 200 нМ) и КРАСИТЕЛЯ LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain (в соответствии с инструкциями производителя). Клетки фиксировали с использованием BD Stabilizing Fixative и фильтровали через фильтровальный планшет AcroPrep Advance перед анализом на проточном цитометре BD LSRFortessa X-20. Данные анализировали посредством программного обеспечения FlowJo. Для определений EC₅₀ измеренные геометрические значения MFI анализировали с

применением 4-параметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой ответа с помощью GraphPad Prism.

mAb1 продемонстрировало связывание, зависимое от концентрации, с активированными первичными Т-клетками человека и яванского макака. mAb1 продемонстрировало минимальное связывание, сопоставимое с таковым у изотипического контроля IgG1, у неактивированных первичных Т-клеток человека и яванского макака (фиг. 6 и фиг. 7). Максимальные значения MFI (обнаруженные при 200 нМ, наивысшая исследованная концентрация) для связывания mAb1 и изотипического контроля IgG1 обобщены в табл. 13 и 14.

Таблица 13

Связывание антитела к GITR с активированными (CD25⁺) и неактивированными (CD25⁻) человеческими первичными Т-клетками

Субпопуляция первичных человеческих Т-клеток	Донор	Макс. MFI ^a	
		mAb1	Изотипический контроль IgG1
CD4 ⁺ CD25 ⁺	7900C	11113	2283
	8700C	13815	1921
	26001	4537	1227
	2700*	4694	2085
CD4 ⁺ CD25 ⁻	7900C	2324	1331
	8700C	2085	1056
	26001	1367	827
	2700*	1331	1406
CD8 ⁺ CD25 ⁺	7900C	9180	2086
	8700C	18177	1971
	26001	7308	1102
	2700*	6183	1991
CD8 ⁺ CD25 ⁻	7900C	1375	1139
	8700C	3243	1778
	26001	1082	644
	2700*	835	1126

^a Максимальную MFI определяли при ненасыщающей концентрации 200 нМ (наивысшая исследованная концентрация).

Таблица 14

Связывание с активированными (CD69⁺) и неактивированными (CD69⁻) первичными Т-клетками яванского макака

Субпопуляция первичных Т-клеток яванского макака	Донор	Макс. MFI ^a	
		mAb1	Изотипический контроль IgG1
CD4 ⁺ CD69 ⁺	58945	4454	1112
	58946	3496	803
	58947	2624	1229
	58948	3856	1027
CD4 ⁺ CD69 ⁻	58945	818	730
	58946	798	650
CD8 ⁺ CD69 ⁺	58947	803	825
	58948	987	817
	58945	2909	1093
	58946	1909	650
CD8 ⁺ CD69 ⁻	58947	1185	921
	58948	2250	1128
	58945	479	565
	58946	584	455
CD8 ⁺ CD69 ⁻	58947	458	601
	58948	558	512

^a Максимальную MFI определяли при ненасыщающей концентрации 200 нМ (наивысшая исследованная концентрация).

Пример 9. Активация NFAT посредством FcγR3a в сконструированных Т-клетках Jurkat

Биологические анализы ADCC с использованием репортерного гена (Parekh et al., mAbs, 4(3): 310-318, 2012) были разработаны для оценки способности mAb1 опосредовать активацию ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) посредством FcγR3a человека или яванского макака (Fc-рецептора, который опосредует ADCC и преимущественно экспрессируется на NK-клетках). В этих анализах ис-

пользовали эффекторные клетки Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a или Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a и целевые клетки Jurkat/hCD20/hG1TR или Jurkat/hCD20/MfG1TR. Клетки Jurkat/hCD20 оценивали как контрольные целевые клетки.

Изотипические контроли mAb1 или IgG1 (конечные концентрации в диапазоне от 916 фМ до 60 нМ) или IgG1 к CD20 (конечные концентрации в диапазоне от 45,8 фМ до 3 нМ) инкубировали в двух повторностях с эффекторными клетками ($2,5 \times 10^4$ клеток/лунка) в присутствии целевых клеток (5×10^4 клеток/лунка) в полной среде Jurkat (RPMI, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови (FBS), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамина). Лунки, не содержащие антитело, включали в качестве контроля для фоновой передачи сигналов. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 часов. Затем планшеты выдерживали до достижения комнатной температуры в течение 10 минут, после чего в лунки добавляли люциферазный субстрат One-Glo на 3 минуты. Используя планшет-ридер ENVISION, активность люциферазы регистрировали как люминесцентный сигнал и выражали в относительных световых единицах (RLU). Для определений EC₅₀ значения RLU анализировали с применением 4-параметрического логистического уравнения по 9-точечной кривой ответа с помощью GraphPad Prism. Кратность изменения активности определяли, взяв соотношение наивысшего RLU на кривой и RLU лунок, не содержащих антитело.

Результаты обобщены в табл. 15. mAb1 опосредовало усиление передачи сигналов NFAT, зависящее от концентрации, в Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a и Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a в присутствии Jurkat/hCD20/hG1TR или Jurkat/hCD20/MfG1TR соответственно с субнанолярными значениями EC₅₀ (фиг. 8). Положительный контроль, IgG1 к CD20, опосредовал усиление передачи сигналов NFAT, зависящее от концентрации, в Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a и Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a в присутствии Jurkat/hCD20 и либо Jurkat/hCD20/hG1TR, либо Jurkat/hCD20/MfG1TR соответственно с субнанолярными значениями EC₅₀. Не наблюдали возрастание исходной активации NFAT ни с mAb1, ни с IgG1 к CD20 в отсутствие целевых клеток (т. е. в среде без клеток, помимо эффекторных клеток) или с изотипическим контролем IgG1 в любых исследуемых условиях.

Таблица 15

Краткое описание mAb1-опосредованной активации NFAT в эффекторных клетках Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a и Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a

Эффекторные клетки Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a						
Антитело	+ целевые клетки Jurkat/hCD20			+ целевые клетки Jurkat/hCD20/hG1TR		
	Макс. RLU ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)	Макс. RLU ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)
mAb1	1,16E+04	1,01	ND	4,30E+05	38,0	3,20E-11
Изотипический контроль IgG1	1,25E+04	1,12	ND	1,21E+04	1,14	ND
IgG1 к CD20	3,27E+05	28,1	2,10E-12	5,14E+05	47,0	2,01E-12
Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a						
Антитело	+ целевые клетки Jurkat/hCD20			+ целевые клетки Jurkat/hCD20/MfG1TR		
	Макс. RLU ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)	Макс. RLU ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)
mAb1	1,25E+04	1,02	ND	2,67E+05	23,9	1,60E-11
Изотипический контроль IgG1	1,31E+04	1,05	ND	1,20E+04	1,09	ND
IgG1 к CD20	2,83E+05	22,1	9,95E-13	3,15E+05	28,6	1,58E-12

^a Максимальное значение RLU определяли как наивысшее среднее значение RLU в исследуемом диапазоне концентраций (от 916 фМ до 60 нМ для mAb1 и изотипического контроля IgG1 и от 45,8 фМ до 3 нМ для IgG1 к CD20).

^b Кратность изменения активности рассчитывали как максимальное значение RLU выше фонового значения (без добавления антитела).

h: человек; Mf: *Maca fascicularis* (яванский макак); ND: не определено, поскольку не наблюдали активность люциферазы, зависящую от концентрации.

Пример 10. Опосредование антителом к G1TR ADCC в отношении Т-клеток Jurkat, сконструированных для экспрессии G1TR человека или яванского макака

Анализ ADCC выполняли для оценки способности mAb1 индуцировать ADCC в отношении Т-клеток, экспрессирующих G1TR человека или яванского макака. В первом эксперименте целевые клетки включали клетки Jurkat/hCD20/hG1TR или клетки Jurkat/hCD20/MfG1TR; клетки Jurkat/hCD20 включали в качестве контрольной линии целевых клеток. Во втором эксперименте целевые клетки включали сти-

мулированные/размноженные Treg (регуляторные Т-клетки) и CD8⁺ Т-клетки из человеческих PBMC (от тех же 3-х доноров). Человеческие NK-клетки, выделенные из обогащенной лейкоцитами цельной крови (от 2 доноров для анализов со сконструированными Т-клетками Jurkat и от 2 доноров для анализов с первичными Т-клетками), использовали в качестве эффекторных клеток в анализах ADCC. Изотипический контроль IgG1 оценивали параллельно с mAb1. IgG1 к CD20 или IgG1 к CD3 использовали в качестве положительного контроля для индуцирования ADCC в отношении сконструированных Т-клеток Jurkat и человеческих первичных Т-клеток соответственно в присутствии NK-клеток.

mAb1 опосредовало ADCC, зависимую от концентрации, в отношении Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR (целевые клетки) в присутствии человеческих первичных NK-клеток (эффекторных клеток); значения EC₅₀ для цитотоксичности находились в субнанолярном диапазоне. И напротив, изотипический контроль IgG1 не опосредовал ADCC в отношении какой-либо из линий целевых клеток при концентрациях в диапазоне от 9,5 фМ до 10 нМ. Добавление NK-клеток в отсутствие обработки антителами приводило в результате к низкой процентной доле неспецифической цитотоксичности в отношении линий целевых клеток.

NK-клетки оценивали на их способность индуцировать ADCC в отношении тех же линий целевых клеток с применением положительного контроля IgG1 к CD20. IgG1 к CD20 опосредовал ADCC в отношении целевых клеток Jurkat/hCD20, Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR зависимым от концентрации образом с субнанолярными значениями EC₅₀ для цитотоксичности. Репрезентативные данные для 2-х доноров человеческих NK показаны на фиг. 9 и обобщены в табл. 16.

Таблица 16

Антителоопосредованная ADCC в отношении сконструированных Т-клеток Jurkat

Антител o	Jurkat/hCD20				Jurkat/hCD20/hGITR				Jurkat/hCD20/MfGITR			
	NK-клетки от донора 6700R		NK-клетки от донора 6500V		NK-клетки от донора 6700R		NK-клетки от донора 6500V		NK-клетки от донора 6700R		NK-клетки от донора 6500V	
	Макс. % цитотокс. ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитотокс. ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитотокс. ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитотокс. ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитотокс. ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитотокс. ^a	EC ₅₀ (M)
mAb1	9	ND	5	ND	27	1,30E-11	30	1,22E-11	26	1,21E-11	34	1,08E-11
Изотип. контр. IgG1	9	ND	9	ND	8	ND	7	ND	3	ND	6	ND
IgG1 к CD20	28	2,49E-11	37	2,58E-11	35	5,30E-11	43	3,81E-11	34	5,18E-11	36	3,12E-11

^a Максимальный % цитотоксичности определяли как наивысший средний процент цитотоксичности в пределах исследуемого диапазона концентраций (от 9,5 фМ до 10 нМ).

h: человек; Mf: *Mascaca fascicularis* (яванский макак); ND: не определено, поскольку не наблюдали цитотоксичность, зависимую от концентрации.

Пример 11. Опосредование антителом к GITR ADCC в отношении человеческих первичных Т-клеток

PBMC выделяли из человеческой цельной крови (3 донора) посредством центрифугирования с использованием градиента плотности среды Ficoll-Paque PLUS и пробирок SepMate в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Затем к выделенным PBMC добавляли буфер для лизиса эритроцитов (RBC) для удаления нежелательных RBC. Затем PBMC промывали и выделяли CD8⁺ Т-клетки с применением CD8 Microbeads в соответствии с инструкциями производителя. Оставшиеся CD8⁻ отрицательные клетки осаждали, а CD4⁺ CD25⁺ Т-клетки выделяли с применением набора для выделения CD4⁺ CD25⁺ регуляторных Т-клеток в соответствии с протоколом производителя.

Выделение CD8⁺ и CD4⁺/CD25⁺ Т-клеток (т. е. Treg) подтверждали с использованием проточной цитометрии. CD8⁺ Т-клетки высевали во флаконы T75 со средой, дополненной LL-2, для размножения с применением CD3/CD28 Dynabeads в соответствии с инструкциями производителя (1 гранула: 1 клетка). Клетки Treg высевали в колбы T75 со средой, дополненной LL-2 и рапамицином, для размножения с использованием частиц CD3/CD28 MACSiBead в соответствии с инструкциями производителя (4 гранулы: 1 клетка). Гранулы удаляли через 5 дней культивирования и клетки выдерживали в среде без LL-2 или рапамицина в течение 24 часов перед использованием в анализе ADCC.

Перед анализом цитотоксичности CD8⁺ Т-клетки и Treg окрашивали так, как это описано в примере 8, и с помощью проточной цитометрии оценивали способность связывания антител (ABC), определяемую как количество молекул антител, связавшихся с клеточной поверхностью в насыщающих условиях. ABC для антитела GITR от Miltenyi Biotec определяли с применением набора гранул Quantum Simply Cellular AF647 MESF (молекулы растворимого флуорохрома) в соответствии с инструкциями производителя.

Целевые клетки (5×10³ клеток/лунка) добавляли в трех повторностях в непрозрачные белые 96-луночные плоскодонные планшеты с последующим добавлением mAb1, изотипического контроля IgG1 или IgG1 к CD20 (для сконструированных Т-клеток Jurkat) или к CD3 (для человеческих первичных Т-клеток) (конечные концентрации в диапазоне от 9,5 фМ до 10 нМ для сконструированных Т-клеток Jurkat от 169 фМ до 10 нМ для человеческих первичных Т-клеток) и последующим добавлением челове-

ских NK-клеток ($2,5 \times 10^4$ клеток/лунка) в среде для анализа (RPMI, с дополненной 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамина). Контрольный образец, который содержал все компоненты, кроме антитела включали в каждый эксперимент для определения фонового сигнала анализа (т. е. неспецифического лизиса целевых клеток в присутствии NK-клеток). Для оценки спонтанного лизиса в отдельных лунках инкубировали необработанные целевые клетки отдельно (целевые клетки) и эффекторных клетки отдельно (эффекторные клетки).

Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 3,5 часа. Затем планшеты выдерживали до достижения комнатной температуры в течение 10 минут, после чего в лунки добавляли реагент CytoTox Glo на 15 минут со встряхиванием. Сигнал люминесценции измеряли как показатель цитотоксичности с применением планшета-ридера ENVISION.

mAb1 опосредовало зависимость от концентрации ADCC в отношении человеческих первичных Т-клеток (целевых клеток) от 3 из 3 доноров, исследованных в присутствии человеческих первичных NK-клеток (эффекторных клеток) со значениями EC₅₀ для цитотоксичности в субнаномолярном диапазоне. Среди 6 исследуемых условий (2 донора эффекторных клеток × 3 донора целевых клеток) опосредованная mAb1 цитотоксичность значительно превышала такую в отношении клеток Treg по сравнению с CD8⁺ Т-клетками в 4 условиях. См. фиг. 10 и табл. 17.

И напротив, изотипический контроль IgG1 не опосредовал ADCC в отношении первичных Т-клеток от любого из доноров. Добавление NK-клеток в отсутствие обработки антителами приводило в результате к низкой процентной доле неспецифической цитотоксичности в отношении первичных Т-клеток.

NK-клетки также оценивали на их способность индуцировать ADCC в анализах с применением NK- и Т-клеток от тех же доноров с положительным контролем IgG1 к CD3. IgG1 к CD3 опосредовал ADCC в отношении первичных Т-клеток зависимым от концентрации образом с субнаномолярными значениями EC₅₀ для цитотоксичности. Репрезентативные данные для первичных NK от 2 людей-доноров, исследованных с первичными Т-клетками от 3 доноров, показаны на фиг. 10 и обобщены в табл. 17.

Таблица 17

Опосредованная антителами ADCC в отношении человеческих первичных Т-клеток

Антитело	NK-клетки от донора 04003 в присутствии											
	Клетки Treg						CD8 ⁺ Т-клетки					
	Донор 5100X GITR ABC: 57069		Донор 0400N GITR ABC: 58810		Донор 0200R GITR ABC: 57243		Донор 5100X GITR ABC: 38152		Донор 0400N GITR ABC: 12712		Донор 0200R GITR ABC: 21987	
	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)
mAb1 ^b	21	8,88E-11	32	3,72E-11	23	3,99E-11	16	1,28E-10	18	7,64E-11	14	8,41E-11
Изотип. контр. IgG1	0,8	ND	2	ND	0,7	ND	0,5	ND	2	ND	2	ND
IgG1 к CD3 ^c	25	7,56E-11	29	4,54E-11	20	2,80E-11	27	6,48E-11	30	4,49E-11	26	1,15E-10
Антитело	NK-клетки от донора 05001 в присутствии											
	Клетки Treg						CD8 ⁺ Т-клетки					
	Донор 5100X GITR ABC: 57069		Донор 0400N GITR ABC: 58810		Донор 0200R GITR ABC: 57243		Донор 5100X GITR ABC: 38152		Донор 0400N GITR ABC: 12712		Донор 0200R GITR ABC: 21987	
	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)	Макс. % цитото ксично сти ^a	EC ₅₀ (M)
mAb1 ^d	11	8,34E-11	17	4,49E-11	7	6,47E-11	11	9,51E-11	7	1,16E-10	9	1,39E-10
Изотип. контр. IgG1	1	ND	3	ND	0,4	ND	2	ND	0,5	ND	1	ND
IgG1 к CD3 ^c	11	2,88E-11	12	6,30E-11	8	4,35E-11	16	3,89E-11	13	5,54E-11	12	1,20E-10

^a Максимальный % цитотоксичности определяли как наивысший средний процент цитотоксичности в диапазоне исследованных концентраций (от 169 фМ до 10 нМ).

^b mAb1 опосредовало значительно более высокую ADCC в отношении клеток Treg по сравнению с CD8⁺ Т-клетками от донора 0400N ($p < 0,0001$) и значительно более высокую ADCC в отношении CD8⁺ Т-клеток по сравнению с клетками Treg от донора 0200R ($p < 0,0001$).

^c IgG1 к CD3 опосредовал значительно более высокую ADCC в отношении CD8⁺ Т-клеток по сравнению с клетками Treg от донора 5100X ($p < 0,0001$).

^d mAb1 опосредовало значительно более высокую ADCC в отношении клеток Treg по сравнению с CD8⁺ Т-клетками от всех 3 доноров ($p < 0,0001$).

Статистическую значимость ADCC во всех исследуемых условиях для NK-клеток от каждого донора определяли посредством двустороннего ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Тьюки ($\alpha = 0,05$).

ABC: способность связывания антител (связанные антитела на клетку с расчетом на основе интенсивности флуоресценции, измеренной посредством проточной цитометрии); ND: не определено, поскольку не наблюдали цитотоксичность, зависящую от концентрации

Пример 12. Опосредование антителом к GITR ADCP в отношении Т-клеток Jurkat, сконструированных для экспрессии GITR человека или яванского макака

Анализ ADCP (антителозависимый клеточный фагоцитоз) выполняли для оценки способности mAb1 индуцировать ADCP в отношении Т-клеток, экспрессирующих GITR человека или яванского макака. Целевые клетки включали клетки Jurkat/hCD20/hGITR или клетки Jurkat/hCD20/MfGITR; клетки Jurkat/hCD20 включали в качестве контрольной линии целевых клеток. Фагоциты, дифференцированные из CD14⁺ моноцитов в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), использовали в качестве эффекторных клеток в анализе ADCP. Изотипический контроль IgG1 оценивали параллельно с mAb1. IgG1 к CD20 использовали в качестве положительного контроля для индуцирования ADCP в отношении сконструированных Т-клеток Jurkat.

Замороженные клетки CD14⁺, полученные от Lonza, оттаивали, ресуспендировали в среде для культивирования клеток (RPMI, дополненной 10% FBS, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамин, 1% человеческой сыворотки крови АВ, NaPyr (пируват натрия), HEPES, NEAA (заменимые аминокислоты) и 0,01 мМ бета-меркаптоэтанол) с добавлением 50 нг/мл GM-CSF и высевали в количестве 5×10⁴ клеток/лунка в прозрачные покрытые коллагеном 96-луночные планшеты с лунками черного цвета для дифференцировки в фагоциты в течение 13 дней с добавлением свежего GM-CSF (50 нг/мл) в день 6 и день 12.

Целевые клетки и фагоциты моноцитарного происхождения инкубировали либо с красителем CellTrace CFSE (карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир), либо с красителем CellTrace Far Red соответственно в течение 15 минут при 37°C, 5% CO₂ для мечения перед анализом ADCP.

Целевые клетки (5×10⁵ клеток/лунка) добавляли в двух повторностях в 96-луночные планшеты с U-образным дном, после чего добавляли mAb1, изотипический контроль IgG1 или IgG1 к CD20 (конечные концентрации в диапазоне от 381 фМ до 100 нМ) в среде для анализа (RPMI, дополненной 10% FBS, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамин) на льду в течение по меньшей мере 15 минут. Целевые клетки без антител включали в качестве контроля фонового фагоцитоза. Затем смесь целевых клеток с титрованным антителом или без него переносили в планшеты, содержащие прикрепленные фагоциты, меченные Far Red, и планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 1-2 часов.

После инкубации из лунок удаляли среду, содержащую неприкрепившиеся клетки, и лунки промывали с использованием PBS. В лунки добавляли раствор 3,7% формальдегида в PBS для фиксации клеток в течение 20 минут. Лунки промывали с использованием PBS и планшеты хранили при 4°C до проведения анализа.

Фагоцитоз анализировали с помощью флуоресцентной визуализации в системе скрининга Opera Phoenix High-Content с применением программного обеспечения Harmony для получения изображений в каналах эмиссии как при 488 нм (целевые клетки, меченные CFSE), так и при 647 нм (фагоциты, меченные Far Red). Анализ изображений выполняли в программном обеспечении Columbus, и фагоцитоз определяли количественно путем сегментации изображения в канале эмиссии при 647 нм для выбора популяции фагоцитов и расчета интенсивности флуоресценции при 488 нм (от целевых клеток, меченных CFSE) внутри каждой фагоцитирующей клетки в относительных единицах флуоресценции (RFU). Для определений EC₅₀ значения RFU анализировали с применением 4-параметрического логистического уравнения по 10- или 9-точечной кривой ответа с помощью GraphPad Prism для анализов со сконструированными Т-клетками Jurkat или человеческими первичными Т-клетками соответственно. Кратность изменения активности определяли, взяв соотношение наивысшего RFU на кривой и RFU лунок, не содержащих антитело.

mAb1 опосредовало зависящую от концентрации ADCP в отношении Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR (целевые клетки) в присутствии человеческих первичных фагоцитов моноцитарного происхождения (эффекторных клеток). Значение EC₅₀ для фагоцитоза Jurkat/hCD20/hGITR нельзя было рассчитать, поскольку 4-параметрическая логистическая регрессия не сходилась к одному значению; значение EC₅₀ для фагоцитоза Jurkat/hCD20/MfGITR находилось в субнанолярном диапазоне. Максимальные уровни mAb1-опосредованного фагоцитоза клеток Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR были сопоставимы с 5,92- и 6,98-кратным изменением активности по сравнению с фоном (отсутствие антител) соответственно. И напротив, изотипический контроль IgG1 не опосредовал ADCP в отношении любого из целевых клеточных линий. Данные по человеческим первичным фагоцитарным клеткам моноцитарного происхождения от донора 1 показаны на фиг. 11 и обобщены в табл. 18.

Человеческие первичные фагоциты моноцитарного происхождения оценивали на их способность индуцировать ADCP в отношении тех же линий целевых клеток с использованием положительного контроля IgG1 к CD20. IgG1 к CD20 опосредовал ADCP в отношении целевых клеток Jurkat/hCD20, Jurkat/hCD20/hGITR и Jurkat/hCD20/MfGITR зависимым от концентрации образом с субнанолярными

значениями EC₅₀ для фагоцитоза.

Таблица 18

Антителоопосредованная ADCP в отношении сконструированных Т-клеток Jurkat

Антител о	Jurkat/hCD20			Jurkat/hCD20/hGITR			Jurkat/hCD20/MfGITR		
	Макс. RFU ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)	Макс. RFU ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)	Макс. RFU ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)
mAb1	3,29E+06	1,10	ND	1,76E+07	5,92	NC	2,03E+07	6,98	5,10E-10
Изотип. контр. IgG1	3,25E+06	1,09	ND	3,18E+06	1,07	ND	2,95E+06	1,02	ND
IgG1 к CD20	1,05E+07	3,73	4,24E-10	1,11E+07	3,60	3,84E-10	1,45E+07	4,57	9,03E-10

^a Максимальное RFU определяли как наивысшее среднее RFU в диапазоне исследованных концентраций (от 381 фМ до 100 нМ).

^b Кратность изменения активности рассчитывали как максимальное RFU выше фонового значения (без добавления антитела).

h: человек; Mf: *Mascaca fascicularis* (яванский макак); NC: не рассчитано, поскольку для набора данных не было найдено уникальное соответствие; ND: не определено, поскольку не наблюдали фагоцитоз, зависимый от концентрации.

Пример 13. Влияние антитела к GITR на пролиферацию первичных CD4⁺ Т-клеток, опосредованную антителом к CD3

Влияние mAb1 на пролиферацию первичных CD4⁺ Т-клеток, опосредованную стимулирующим антителом к CD3, оценивали в присутствии вспомогательных клеток HEK293/FcγR2b. Оценивали человечески первичные CD4⁺ Т-клетки от 6 доноров.

Клетки HEK293/FcγR2b инкубировали в 50 мкг/мл митомицина С в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂ и высеивали в 96-луночный плоскодонный планшет для тканевых культур в количестве 1×10⁵ клеток/луночка на ночь при 37°C, 5% CO₂.

CD4⁺ Т-клетки выделяли из РВМС от 6 доноров с использованием центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS с последующим истощением Т-клеток памяти с применением микрогранул CD45RO человека в соответствии с протоколом производителя; наивные CD4⁺ Т-клетки ресуспендировали в среде для анализа (RPMI, дополненной 5% человеческой сыворотки крови АВ, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамин).

В день проведения анализа высевные клетки HEK293/FcγR2b предварительно инкубировали с 1,2 мкг/мл ОКТ3 в течение 20 мин при комнатной температуре с последующим добавлением 5×10⁵ наивных CD4⁺ Т-клеток на лунку и либо mAb1, либо изотипического контроля IgG1 при конечных концентрациях в диапазоне от 32 фМ до 133 нМ.

Планшеты инкубировали в течение 4 дней при 37°C, 5% CO₂, в клеткам добавляли 0,5 мкКи тритированного тимидина и планшеты инкубировали еще 16 часов. Тимидин и, следовательно, тритий будут в больших количествах встраиваться в делящиеся клетки.

После инкубации клетки собирали на 96-луночные планшеты UniFilter и в каждую лунку добавляли 35 мкл сцинтилляционного раствора. Встраивание трития измеряли в количестве импульсов в минуту (СРМ) с применением прибора Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount NXT. Все серийные разведения исследовали в двух повторностях.

Значения EC₅₀ для антител определяли с использованием 4-параметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой ответа с применением программного обеспечения GraphPad Prism™. Максимальную пролиферацию определяли как среднее максимальное СРМ, обнаруженное в диапазоне исследуемых концентраций. Кратность изменения активности определяли, взяв соотношение наивысшего СРМ на кривой и СРМ лунок, не содержащих антитело.

mAb1 усиливало пролиферацию Т-клеток, опосредованную антителом к CD3, зависимым от концентрации образом с субнанолярными значениями EC₅₀ (фиг. 12) и это было ассоциировано с 2,3-3,1-кратным возрастанием максимальной пролиферации Т-клеток (измеряемой в СРМ при распаде трития) выше фонового значения. И напротив, изотипический контроль IgG1 не способствовал зависимому от концентрации усилению пролиферации Т-клеток. Результаты обобщены в табл. 19.

Таблица 19

Влияние антитела к GITR на пролиферацию первичных CD4⁺ Т-клеток, опосредованную антителом к CD3

Донор	mAb1			Изотипический контроль IgG1		
	Макс. СРМ ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)	Макс. СРМ ^a	Кратность изменения активности ^b	EC ₅₀ (М)
1900G	4875	3,14	4,30E-10	2620	1,69	ND
41003	5774	2,54	NC	2610	1,15	ND
3600Y	2707	2,30	1,72E-08	1720	1,46	ND
34001	1401	2,62	1,93E-10	841	1,57	ND
2000U	10722	2,45	3,91E-11	5631	1,29	ND
3800U	1505	2,45	1,07E-10	1064	1,73	ND

^a Максимальное СРМ определяли как наивысшее среднее СРМ в диапазоне исследованных концентраций (от 32 фМ до 133 нМ).

^b Кратность изменения активности рассчитывали как максимальное СРМ выше фонового значения (без добавления антитела).

NC: не рассчитано, поскольку 4-параметрическая логистическая регрессия не сходилась к одному значению; ND: не определено, поскольку не наблюдали секрецию пролиферацию, зависимую от концентрации.

Пример 14. Влияние антитела к GITR на связывание GITR с GITR-L в блокирующем ELISA

Связывание рекомбинантного hGITR с его лигандом hGITR-L определяли с использованием анализа связывания на основе твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA). Рекомбинантный hGITR-L в концентрации 2 мкг/мл, разведенный в PBS, пассивно адсорбировали на титрационном микропланшете и инкубировали в течение ночи при 4°C с последующим блокированием путем добавления PBS с 0,5% BSA. Затем в планшеты в двух повторностях добавляли рекомбинантный эктодомен человеческого белка GITR в мономерной форме, hGITR.mmH, в диапазоне концентраций (от 3,4 пМ до 200 нМ). Планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с последующими 4 промывками с использованием PBS, содержащим 0,05% Tween-20 (PBST). Иммуобилизованные на планшете hGITR.mmH обнаруживали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) козьего антитела к сМус в концентрации 0,33 мкг/мл и визуализировали с применением колориметрического субстрата HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) в соответствии с рекомендуемыми производителем процедурами. Данные поглощения при 450 нм (OD₄₅₀) наносили на график в зависимости от концентрации рекомбинантного hGITR.mmH. Образец только с буфером включали для определения фонового сигнала; однако его OD₄₅₀ не наносили на кривую ответа. Данные связывания анализировали с использованием 4-параметрического логистического уравнения по 11-точечной кривой ответа с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и рассчитывали значения EC₅₀. Значения EC₅₀ определяли как концентрацию hGITR.mmH, при которой наблюдается 50% максимального связывания. Концентрацию, близкую к значению EC₅₀ (в пределах линейного диапазона), выбирали в качестве фиксированной концентрации hGITR.mmH для анализа блокирования.

Анализ блокирования на основе ELISA был разработан для определения способности mAb1 блокировать связывание рекомбинантного человеческого GITR (hGITR.mmH) с hGITR-L. Рекомбинантный hGITR.mmH в фиксированной концентрации (1,5 нМ) предварительно инкубировали с изотипическим контролем mAb1 или IgG1 (от 51 пМ до 3 мкМ) в течение 1 часа. Предварительно инкубированные растворы переносили в парные лунки титрационных микропланшетов, которые предварительно покрывали GITR-L согласно описанному выше. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем 4 раза промывали с использованием PBST и определяли связанный с планшетом hGITR.mmH согласно описанному выше. Данные абсорбции при OD₄₅₀ наносили на график в зависимости от концентрации антител. Данные связывания анализировали с использованием 4-параметрического логистического уравнения по 11-точечной кривой ответа с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и рассчитывали значения IC₅₀. Значения IC₅₀ определяли как концентрацию антитела, необходимую для блокирования 50% связывания hGITR.mmH с hGITR-L, которым покрыт планшет.

Влияние mAb1 или изотипического контроля IgG1 на связывание рекомбинантного эктодомена человеческого белка GITR в мономерной форме (hGITR.mmH) с иммобилизованным человеческим GITR-L (6His.GCN4.G4Sx3.hGITR-L) показано на фиг. 13. Значения IC₅₀ и максимальный процент подавления для антител обобщены в табл. 20.

Таблица 20

Блокирование связывания hGITR.mmH с иммобилизованным человеческим GITR-L		
Антитело	IC ₅₀ (М)	% макс. подавления
mAb1	6,66E-09	98
Изотипический контроль IgG1	ND	-6

% максимального блокирования = процент блокирования при максимальной концентрации антитела.

ND: не определено, поскольку не наблюдали подавление связывания, зависимое от концентрации.

Рекомбинантный hGITR.mmH связывался с иммобилизованным человеческим GITR-L зависимым от концентрации образом со значением EC₅₀, составляющим 2,05 нМ. Концентрацию 1,5 нМ, близкую к значению EC₅₀ (в пределах линейного диапазона), выбрали в качестве фиксированной концентрации рекомбинантного hGITR.mmH для анализа блокирования.

mAb1 блокировало связывание hGITR.mmH с hGITR-L зависимым от концентрации образом с максимальным подавлением, составляющим 98%, и значением IC₅₀, составляющим 6,66 нМ. Изотипический контроль IgG1 не подавлял связывание hGITR.mmH с человеческим GITR-L ни в одной из исследованных концентраций.

Пример 15. Влияние антитела к GITR на CDC

Способность mAb1 опосредовать CDC в отношении сконструированных Т-клеток Jurkat, экспрессирующих GITR человека или яванского макака, в присутствии сывороточного комплемента оценивали в анализе цитотоксичности. Регистрировали максимальный процент цитотоксичности и значения EC₅₀.

Анализы CDC выполняли для оценки способности mAb1 индуцировать CDC в отношении Т-клеток, экспрессирующих GITR человека или яванского макака. Целевые клетки включали клетки Jurkat/hCD20/hGITR или клетки Jurkat/hCD20/MfGITR; клетки Jurkat/hCD20 включали в качестве контрольной линии целевых клеток. Изотипический контроль IgG1 оценивали параллельно с mAb1. IgG1 к CD20 использовали в качестве положительного контроля для индуцирования CDC в отношении сконструированных Т-клеток Jurkat в присутствии факторов сывороточного комплемента.

Целевые клетки (5×10³ клеток/лунка) добавляли в трех повторностях в непрозрачные белые 96-луночные плоскодонные планшеты с последующим добавлением mAb1, изотипического контроля IgG1 или IgG1 к CD20 (конечные концентрации в диапазоне от 477 фМ до 500 нМ), с последующим добавлением сыворотки крови (5% конечного объема) в среду для анализа (RPMI, дополненной 1% BSA, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамин); параллельно добавляли только среду для анализа для оценки лизиса в отсутствие факторов комплемента. Контрольный образец, представляющий собой буфер, который содержал все компоненты за исключением антитела, включали в каждый эксперимент для определения фонового сигнала анализа (т. е. неспецифического лизиса целевых клеток).

Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 3,5 часа. Затем планшеты выдерживали до достижения комнатной температуры в течение 30 минут, после чего в лунки добавляли реагент CytoTox Glo на 15 минут со встряхиванием. Сигнал люминесценции измеряли как показатель цитотоксичности с применением планшет-ридера ENVISION.

Цитотоксический ответ рассчитывали следующим образом:

$$(\%) \text{ Цитотоксичность} = \frac{\text{Экспериментальный сигнал} - \text{SBS}^a \text{ (целевые клетки)}}{\text{Максимальный сигнал (целевые клетки без дипитонина)} - \text{cSBS (целевые клетки)}}$$

^a SBS, спонтанный фоновый сигнал.

Для определений EC₅₀ процент цитотоксичности анализировали с использованием 4-параметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой ответа с помощью GraphPad Prism.

mAb1 не опосредовало CDC в отношении целевых клеток Jurkat/hCD20, Jurkat/hCD20/hGITR или Jurkat/hCD20/MfGITR при концентрациях в диапазоне от 477 фМ до 500 нМ в присутствии 5% NHS. Аналогично CDC не наблюдали для целевых клеток, инкубированных с контрольным изотипическим антителом IgG1 (фиг. 14).

NHS, используемый в анализе, оценивали в тех же линиях целевых клеток в отношении способности индуцировать CDC с применением положительного контроля, представляющего собой IgG1 к CD20. В присутствии NHS IgG1 к CD20 опосредовал CDC в отношении всех 3 линий целевых клеток зависимым от концентрации образом. В отсутствие NHS IgG1 к CD20 не опосредовал лизис ни одной из исследуемых линий целевых клеток.

Пример 16. Способность антитела к GITR образовывать иммунные комплексы, способные к связыванию C1q

Способность mAb1 образовывать иммунные комплексы, способные к связыванию C1q, оценивали с применением рекомбинантного растворимого эктодомена белка GITR в мономерной (hGITR.mmH) или

димерной (hGITR.mFc) форме и набора MicroVue CIC-C1q EIA. В качестве положительного контроля также оценивали связывание агрегированного при нагревании гамма-глобулина (HAGG) с C1q.

mAb1 или изотипический контроль IgG1 в концентрации 30 нМ инкубировали либо с hGITR.mmH, либо с hGITR.mFc в молярном соотношении 1:1. Также оценивали контроли, содержащие 30 нМ mAb1, изотипический контроль IgG1, hGITR.mmH или hGITR.mFc отдельно. Образцы инкубировали в течение 30 минут при 37°C в 0,1% (вес/объем) бычьим сывороточном альбумине (BSA) в DPBS (pH 7,4). Каждый образец оценивали в трех повторностях.

Для оценки связывания комплексов с C1q образцы разбавляли в 50 раз буфером из набора для анализа в планшете для ELISA, покрытом белком C1q, и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Лунки промывали для удаления несвязанного белка и в каждую лунку добавляли козье антитело к IgG человека, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) (набор MicroVue CIC-C1q EIA), для обнаружения C1q-связанных иммунных комплексов. После отмывания несвязанного HRP-конъюгата связанные комплексы обнаруживали посредством добавления субстрата фермента. Поглощение измеряли при 405 нм посредством многофункционального планшета-ридера Perkin Elmer VICTOR X5.

Стандарт для анализа CIC-C1q, HAGG, использовали для построения линейной кривой стандартного образца на основе коэффициентов поглощения для 0, 15 и 38 эквивалентов HAGG мкг на мл (мкг экв./мл). Концентрацию мкг экв./мл для каждого исследуемого образца определяли по указанной стандартной кривой. Также использовали положительные контроли с высоким и низким HAGG. Ожидалось, что контроль с высоким уровнем HAGG даст в результате диапазон от 11 до 26 мкг экв./мл в анализе, а контроль с низким уровнем HAGG, как ожидается, будет составлять менее 4 мкг экв./мл. Производитель набора определяет значения менее 4 мкг экв./мл как отрицательные для значимых уровней CIC, связанных с C1q.

Связывание C1q не наблюдали в образцах, содержащих mAb1 и либо hGITR.mmH, либо hGITR.mFc (фиг. 15). Аналогично связывание C1q не наблюдали в образцах, содержащих изотипический контроль IgG1 и либо hGITR.mmH, либо hGITR.mFc. Связывание C1q не наблюдали в образцах, содержащих mAb1, изотипический контроль IgG1, hGITR.mmH или hGITR.mFc отдельно. Положительные контроли с высоким и низким уровнями HAGG анализировали параллельно и связывание C1q каждого образца наблюдали в пределах ожидаемого соответствующего диапазона.

Пример 17. Влияние антитела к GITR в комбинации с цемиплимабом на секрецию IL-2 человеческими первичными Т-клетками, стимулированными посредством сконструированных клеток RBL-2H3

В данном примере исследовали агонистический эффект mAb1 в отношении стимулированной антителом к CD3 секреции IL-2 первичными человеческими CD3⁺ Т-клетками, полученными от 2 доноров. CD3⁺ Т-клетки выделяли из PBMC, полученных от 2 доноров. У одного донора PBMC выделяли из периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS. У другого донора PBMC выделяли из периферической крови здорового донора с использованием набора EasySep Direct Human PBMC Isolation Kit от Stem Cell Technologies и в соответствии с протоколом производителя. Выделенные PBMC от обоих доноров замораживали по отдельности в FBS, содержащем 10% DMSO.

Для выделения CD3⁺ Т-клеток замороженные флаконы с PBMC оттаивали на водяной бане при 37°C и разбавляли в среде для стимуляции (среда для культивирования клеток X-VIVO 15, дополненная 10% FBS, NEMES, NaPyr, NEAA и 0,01 мМ BME), содержащей 50 ЕД/мл нуклеазы Benzonase. Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут, ресуспендировали в буфере EasySep и выделяли с использованием набора StemCell Technologies EasySep T-Cell Isolation в соответствии с протоколом производителя.

CD3⁺ Т-клетки ресуспендировали в среде для стимулирования и высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации 1×10^5 клеток/лунка. Клетки RBL-2H3/ α CD3 или RBL-2H3/ α CD3/hPD-L1 обрабатывали 10 мкг/мл митомицина С в среде для первичной стимуляции в концентрации 10×10^6 клеток/мл. После инкубации в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂ клетки, обработанные митомицином С, промывали 3 раза с использованием D-PBS, содержащим 2% FBS, и добавляли в лунки, содержащие Т-клетки, в конечной концентрации 5×10^4 клеток/лунка. Затем в лунки добавляли комбинации антител mAb1 или изотипического контроля IgG1 в конечных концентрациях в диапазоне от 3 пМ до 200 нМ и цемиплимаба или изотипического контроля IgG4^p в фиксированной концентрации 20 нМ. Конечная точка 10-точечного разведения не содержала оттитрованных антител. Планшеты инкубировали в течение 3 дней при 37°C с 5% CO₂ и затем центрифугировали для осаждения клеток. Для секреции IL-2 5 мкл супернатантов анализировали с применением набора Human IL-2 от PerkinElmer в соответствии с протоколом производителя. Результаты измерений IL-2 получали на многофункциональном планшете-ридере Envision от PerkinElmer. Все серийные разведения исследовали в трех повторностях.

Значения EC₅₀ для антител определяли с использованием 4-параметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой ответа с применением программного обеспечения GraphPad Prism. Максимальную секрецию IL-2 определяли как средний максимальный ответ, обнаруженный в диапазоне исследуемых концентраций.

В отсутствие PD-L1 на целевых клетках RBL-2H3/ α CD3 mAb1 обеспечивало повышение секреции IL-2 дозозависимым образом независимо от фиксированной концентрации цемиплимаба. Т-клетки обоих доноров показали сходные значения EC₅₀ и максимальные значения IL-2 независимо от цемиплимаба образом (фиг. 16).

В присутствии PD-L1 на клетках RBL-2H3/ α CD3 исходные уровни IL-2 были снижены по сравнению с целевыми клетками, лишенными PD-L1, представляющими собой Т-клетки от обоих доноров. Однако добавление фиксированной концентрации цемиплимаба обеспечивало повышение исходных значений IL-2. mAb1, независимым от цемиплимаба образом, обеспечивало дозозависимое повышение IL-2, а добавление цемиплимаба дополнительно повышало максимальные уровни секреции IL-2 Т-клетками от обоих доноров (фиг. 16).

Результаты обобщены в табл. 21.

Таблица 21

Краткое описание влияния mAb1 в комбинации с цемиплимабом на секрецию IL-2 первичными Т-клетками, стимулированными антителом к CD3

Комбинация антител ^a		CD3 ⁺ Т-клетки от донора 555105				CD3 ⁺ Т-клетки от донора 555130			
		RBL-2H3/ α CD3		RBL-2H3/ α CD3/hPD-L1		RBL-2H3/ α CD3		RBL-2H3/ α CD3/hPD-L1	
		Макс. IL-2 ^b (пг/мл)	EC ₅₀ (М)	Макс. IL-2 ^b (пг/мл)	EC ₅₀ (М)	Макс. IL-2 ^b (пг/мл)	EC ₅₀ (М)	Макс. IL-2 ^b (пг/мл)	EC ₅₀ (М)
mAb1	Цемиплимаб	33,3	1,95E-10	36,0	1,49E-10	170	7,30E-11	146	1,09E-10
	Изотипический контроль IgG4 ^P	38,2	1,19E-10	15,5	2,00E-10	173	8,92E-11	42,3	NC
Изотипический контроль IgG1	Цемиплимаб	15,7	ND	21,7	ND	55,8	ND	37,3	ND
	Изотипический контроль IgG4 ^P	17,4	ND	4,62	ND	63,8	ND	8,85	ND

^a Максимальная концентрация IL-2 представляет собой наивысшее среднее значение концентрации IL-2, зарегистрированное в пределах исследуемого диапазона концентраций антител (от 76 фМ до 200 нМ).

^b Цемиплимаб или изотипический контроль IgG4^P исследовали при фиксированной концентрации, составляющей 20 нМ.

NC: не рассчитано, поскольку 4-параметрическая логистическая регрессия не сходилась к одному значению; ND: не определено, поскольку не наблюдали секрецию IL-2, зависящую от концентрации.

Краткие выводы

Приведенные выше примеры продемонстрировали, что mAb1 способно связываться с GITR человека и яванского макака, экспрессируемым на клеточной поверхности Т-клеток, и усиливать опосредованную рецептором Fc γ активацию NFAT в суррогатных анализах ADCC с использованием репортерного гена. Соответственно, mAb1 индуцировало ADCP сконструированных Т-клеток и опосредовало предпочтительную ADCC в отношении клеток Treg по сравнению с CD8⁺ Т-клетками. В то же время mAb1 не было способно опосредовать CDC сконструированных Т-клеток, экспрессирующих GITR, или образовывать иммунные комплексы, способные к связыванию C1q. mAb1 также блокировало связывание человеческого GITR с человеческим GITR-L. mAb1, независимым от цемиплимаба образом, приводило в результате к дозозависимому повышению уровня IL-2, а добавление цемиплимаба дополнительно повышало максимальные уровни IL-2.

Пример 18. Антитела к GITR истощают внутриопухолевые регуляторные Т-клетки и увеличивают соотношение CD8⁺ Т-клетки/регуляторные Т-клетки

В данном эксперименте оценивали способность исходного антитела к GITR, CompAb1, и соответствующих вариантов, mAb1 и mAb2, истощать регуляторные Т-клетки внутри опухоли. Самкам гуманизированных мышей GITR/GITR-L в возрасте двенадцати недель подкожно имплантировали клетки аденокарциномы толстой кишки мышей MC38 ($3,0 \times 10^5$ клеток/мышь). CompAb1, mAb1 или mAb2 вводили в день 6 посредством внутрибрюшинной (в/бр) инъекции. Мышей подвергали эвтаназии в день 11 и отбирали опухолевые ткани для анализа посредством FACS. Образцы FACS анализировали посредством BD Fortessa X20 и программного обеспечения Flowjo.

Данные показаны на фиг. 17. В целом, однократная обработка антителами к GITR опосредовала значительное истощение внутриопухолевых клеток Treg и увеличила соотношение CD8⁺ Т-клетки/T-reg. CompAb1 и вариант N101D, mAb1, более последовательно истощали T-reg и повышали соотношение CD8/Treg по сравнению с вариантом N101E, mAb2.

Пример 19. Противоопухолевая эффективность в случае применения только mAb1 у GITR/GITR-L-гуманизированных мышей и в случае применения mAb1 в комбинации с цемиплимабом у GITR/GITR-L/PD-1-гуманизированных мышей с аденокарциномой толстой кишки мышей

Самкам GITR/GITR-L/PD-1-гуманизированных мышей в возрасте от 9 до 14 недель подкожно имплантировали клетки аденокарциномой толстой кишки MC38 (3×10^5 клеток в 100 мкл PBS) в правый бок

в день 0. Через шесть дней после имплантации (в день 6), когда объем опухолей составлял в среднем 43 мм³, мышей рандомизировали в 5 групп и вводили первую дозу 10 мг/кг изотипического контроля IgG1 + 1 мг/кг изотипического контроля IgG4P (n = 7), 10 мг/кг изотипического контроля IgG1 + 1 мг/кг цемиплимаба (n=7), 10 мг/кг mAb1 + 1 мг/кг цемиплимаба (n=7), 1 мг/кг mAb1 + 1 мг/кг цемиплимаба (n=6) или 0,1 мг/кг mAb1 + 1 мг/кг цемиплимаба (n=7). Все мыши получали дополнительные дозы в день 13, всего 2 дозы. У мышей отбирали кровь в дни 7, 12, 14 и 20 для мониторинга концентрации антител в сыворотке крови. Рост опухоли контролировали путем измерения объема опухоли штангенциркулем в дни 5, 10, 13, 17, 20, 26, 28, 31, 34, 38, 41, 45, 48, 52, 60, 68 и 75. Наблюдение за всеми мышами осуществляли до дня 75, если только их не подвергли эвтаназии раньше вследствие опухолевой нагрузки.

Статистически значимое снижение роста опухоли наблюдали у мышей, которым вводили цемиплимаб в дозе 1 мг/кг в комбинации с 0,1, 1 или 10 мг/кг mAb1, по сравнению с мышами, которым вводили изотипические контрольные антитела (1 мг/кг изотипического контроля IgG4^P в комбинации с 10 мг/кг изотипического контроля IgG1) (фиг. 18). Численно большее снижение роста опухоли наблюдали у мышей, получавших цемиплимаб в дозе 1 мг/кг в комбинации с 10 мг/кг mAb1 (в отличие от 0,1 или 1 мг/кг mAb1), по сравнению с мышами, которым вводили только цемиплимаб (1 мг/кг цемиплимаба в комбинации с 10 мг/кг изотипического контроля IgG1); однако разница не достигала статистической значимости (скорректированное p = 0,0525).

Дозы только цемиплимаба 1 мг/кг приводили в результате к клиренсу опухолевых клеток у 2 из 7 мышей (фиг. 19B). Дозы с добавлением mAb1 к цемиплимабу приводили в результате к увеличению частоты клиренса опухолевых клеток при наивысшей исследуемой дозе mAb1 10 мг/кг (5 из 7 мышей; фиг. 19C), но не при более низких дозах mAb1 1 и 0,1 мг/кг (2 из 6 и 2 из 7 мышей соответственно; фиг. 19D и E). У всех мышей с клиренсом опухолевых клеток опухоли отсутствовали до конца исследования (день 75, через примерно 9 недель после введения последней дозы). Как и ожидалось, у мышей, которым вводили изотипические контрольные антитела, не наблюдали клиренса опухолевых клеток (фиг. 19A).

Статистически значимые отличия в выживаемости между группами были выявлены посредством совокупного теста Гехана-Бреслоу-Уилкоксона (p = 0,0105); дополнительные тесты Гехана-Бреслоу-Уилкоксона выполняли для групповых сравнений. Значительное увеличение выживаемости наблюдали у мышей, которым вводили цемиплимаб в дозе 1 мг/кг в комбинации с 1 или 10 мг/кг mAb1 (выживаемость 33% и 71% соответственно) по сравнению с мышами, которым вводили изотипические контрольные антитела (выживаемость отсутствует) (фиг. 20). Кроме того, у мышей, получавших цемиплимаб в дозе 1 мг/кг в комбинации с 10 мг/кг mAb1 (в отличие от 0,1 или 1 мг/кг mAb1), наблюдали значительное увеличение выживаемости по сравнению с мышами, которым вводили только цемиплимаб (выживаемость 29%).

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. И действительно, разные модификации настоящего изобретения, представленные в данном документе, помимо описанных в данном документе будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из:

(а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 22 или 28; и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10;

(b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 22 или 28; и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10;

(c) антитела, содержащего аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 26 или 32, и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 20; и

(d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего три CDR тяжелой цепи в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, модифицированной посредством мутации N101D или N101E; и три CDR легкой цепи в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 22.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 28.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие LCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где выделенное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где выделенное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9 или 10, где выделенное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

12. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела по любому из пп.1-11.

13. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-11.

14. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, указанную в п.12 или 13.

15. Выделенная клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по п.14.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

17. Применение фармацевтической композиции по п.16 в способе лечения рака у субъекта.

18. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 в способе модулирования противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, страдающего раком.

19. Применение по п.17 или 18, где способ дополнительно включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются со вторым рецептором, активирующим Т-клетки, где рецептор, активирующий Т-клетки, представляет собой CD28, OX40, CD137, CD27 или HVEM.

20. Применение по п.17 или 18, где способ дополнительно включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с рецептором, подавляющим Т-клетки, где рецептор, подавляющий Т-клетки, представляет собой CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA или LAG-3.

21. Применение по п.20, где рецептор, подавляющий Т-клетки, представляет собой PD1, и антитело, которое связывается с Т-клеточным рецептором, представляет собой цемиплимаб.

22. Применение по п.17 или 18, где способ дополнительно включает введение средства лучевой терапии указанному субъекту.

23. Применению по п.17 или 18, где способ дополнительно включает введение одного или более химиотерапевтических средств.

24. Применение по п.17 или 18, где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

25. Способ лечения рака, включающий введение фармацевтической композиции по п.16 нуждающемуся в этом субъекту.

26. Способ модулирования противоопухолевого иммунного ответа, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 субъекту страдающему раком.

27. Способ по п.25 или 26, дополнительно включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются со вторым рецептором, активирующим Т-клетки, где рецептор, активирующий Т-клетки, представляет собой CD28, OX40, CD137, CD27 или HVEM.

28. Способ по п.25 или 26, дополнительно включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с рецептором, подавляющим Т-клетки, где рецептор, подавляющий Т-клетки, представляет собой CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA или LAG-3.

29. Способ по п.28, где рецептор, подавляющий Т-клетки, представляет собой PD1, и антитело, которое связывается с Т-клеточным рецептором, представляет собой цемиплимаб.

30. Способ по п.25 или 26, дополнительно включающий введение субъекту средства лучевой терапии.

31. Способ по п.25 или 26, дополнительно включающий введение субъекту одного или более химиотерапевтических средств.

32. Способ по п.25 или 26, где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

33. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту:

(i) антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и

(ii) цемиплимаба.

34. Способ по п.33, где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

35. Применение антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, в изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для применения в способе лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента и цемиплимаба.

36. Применение по п.35, где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

37. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в способе лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает введение субъекту:

(i) указанного антитела к GITR или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и

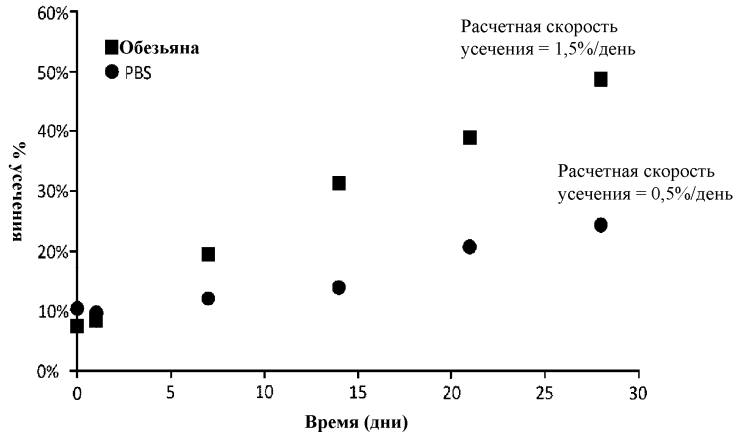
(ii) цемиплимаба.

38. Применение по п.37, где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточного рака кожи, плоскоклеточной карциномы кожи (CSCC), миеломы, рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака шейки матки, например плоскоклеточной карциномы шейки матки (цервикальной SCC), рака молочной железы и почечно-клеточной карциномы (RCC), аденокарциномы, колоректального рака (CRC), карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, рака яичка, рака пищевода, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака, ранее не леченного посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа (ICB), и рака, леченного посредством ICB.

39. Применение по любому из пп.24, 36 или 38, где рак желудка представляет собой рак желудка с амплификацией MET.

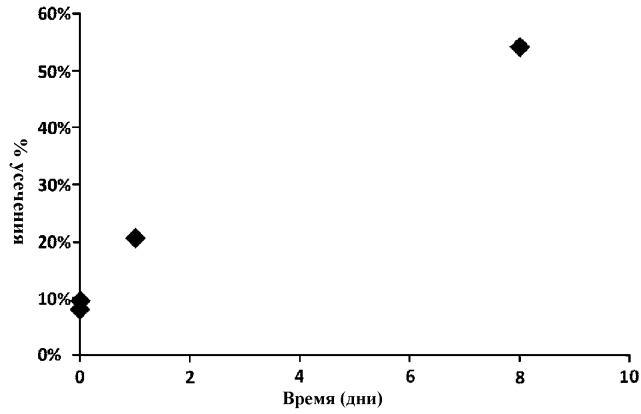
40. Способ по п.32 или 34, где рак желудка представляет собой рак желудка с амплификацией MET.

Повышение усечения, наблюдаемое у СomрAb1 при инкубации в сыворотке крови обезьяны и PBS



Фиг. 1

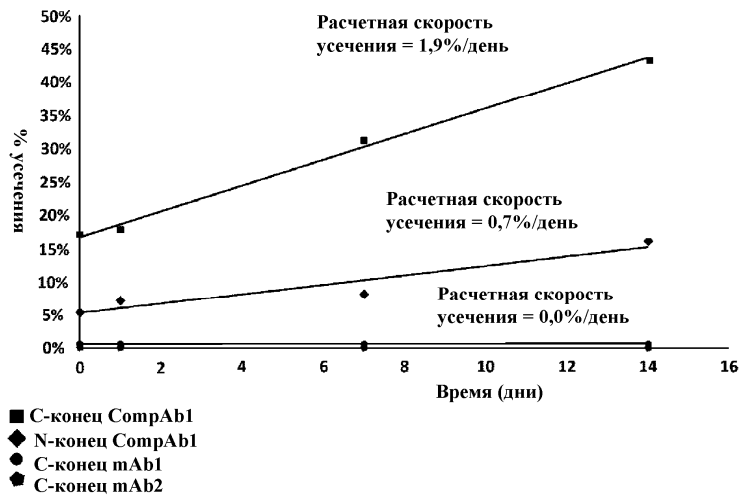
Повышение усечения, наблюдаемое у СomрAb1 при введении в дозе 10 мг/кг мышам



Примечание: СomрAb1 добавляли в сыворотку крови мыши и PBS до сосаждения в качестве контроля день 0

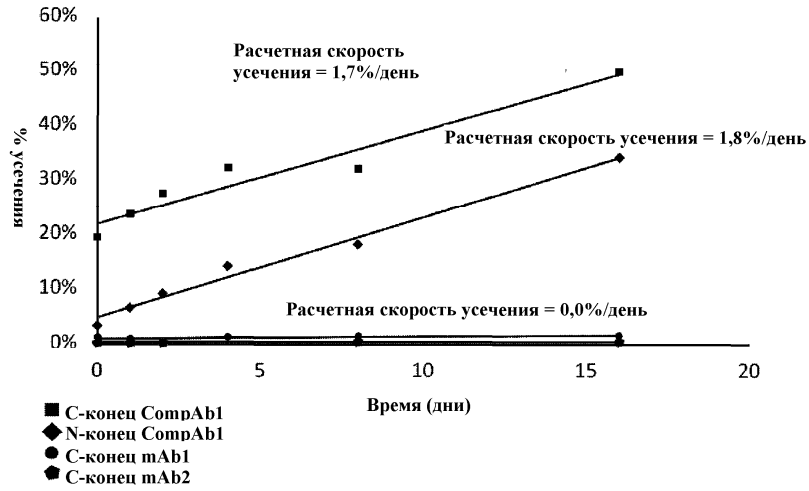
Фиг. 2

Повышение усечения у СomрAb1 и его отсутствие у вариантов mAb1 или mAb2 после инкубации в сыворотке крови человека, обедненной по IgG



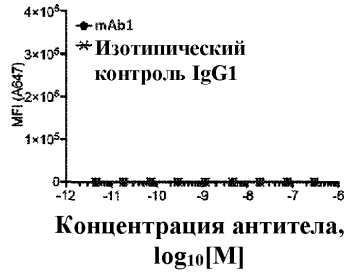
Фиг. 3

Повышение усечения у CompAb1 и его отсутствие у вариантов mAb1 или mAb2 после инкубации *in vitro* в мышиной сыворотке крови



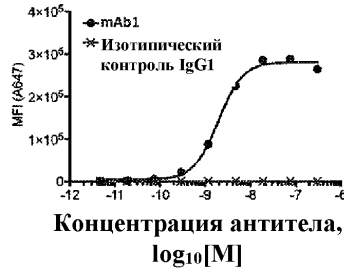
Фиг. 4

Jurkat/hCD20



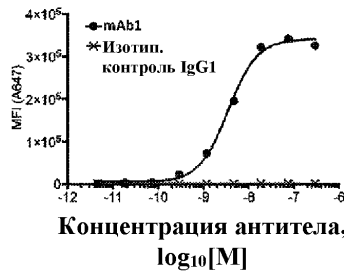
Фиг. 5А

Jurkat/hCD20/hGITR



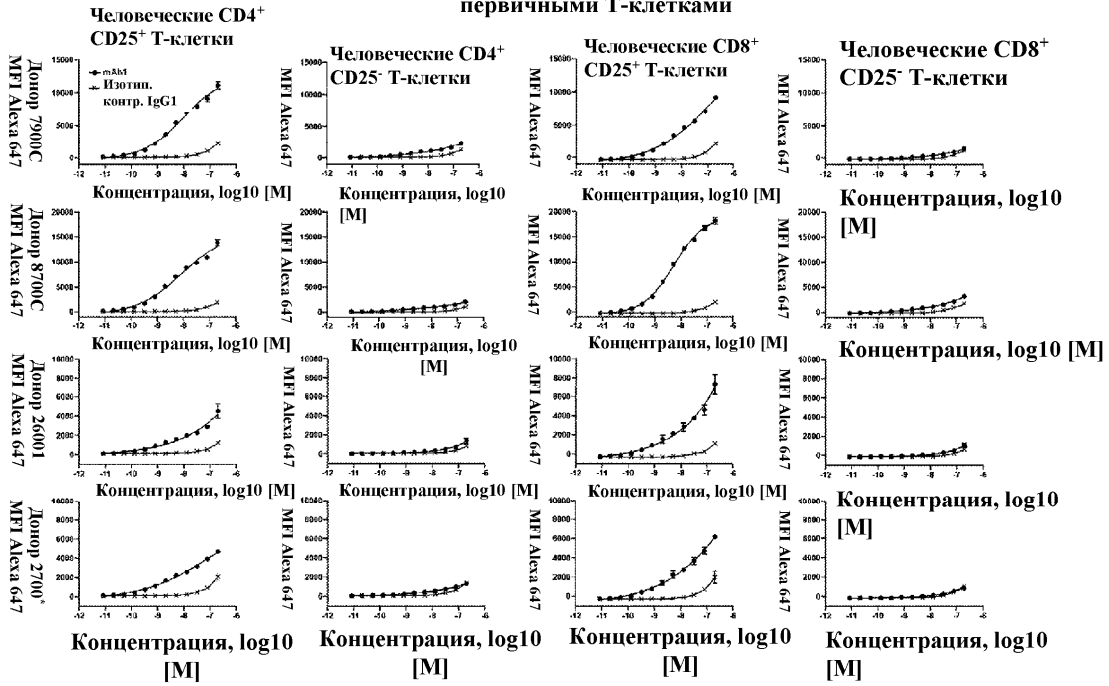
Фиг. 5В

Jurkat/hCD20/MfGITR



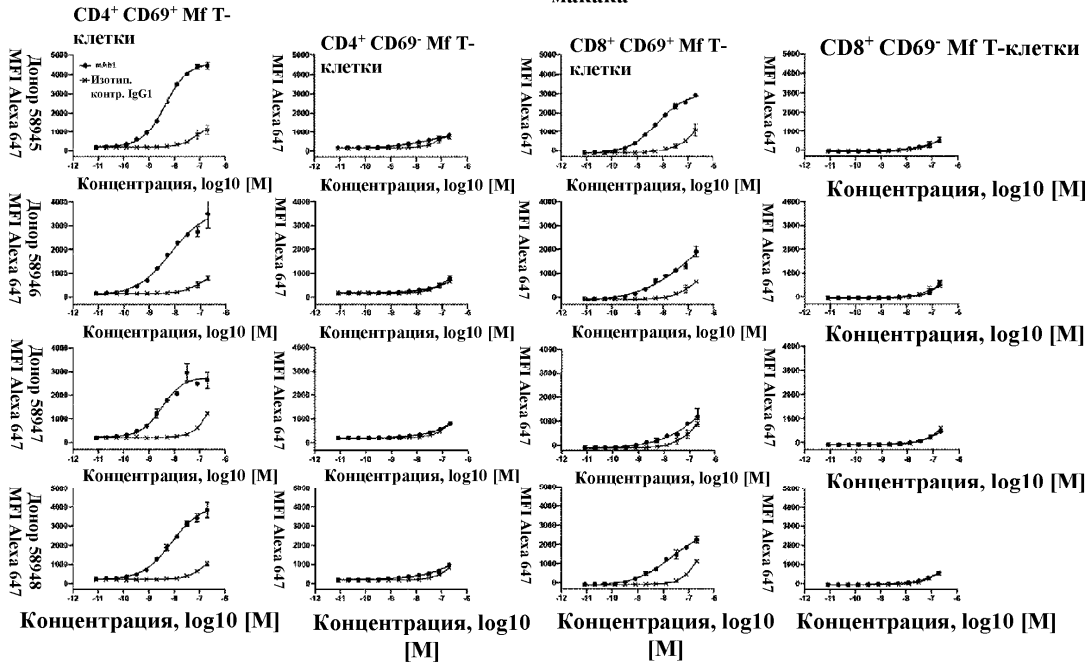
Фиг. 5С

Связывание с активированными (CD25⁺) человеческими первичными Т-клетками



Фиг. 6

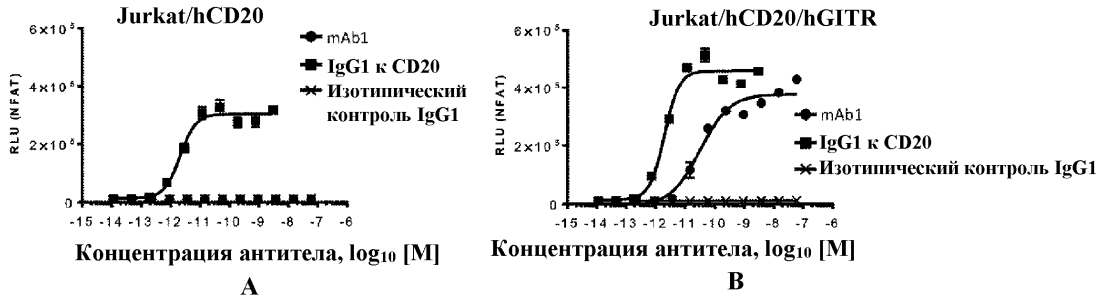
Связывание с первичными CD69⁺ Т-клетками яванского макака



Фиг. 7

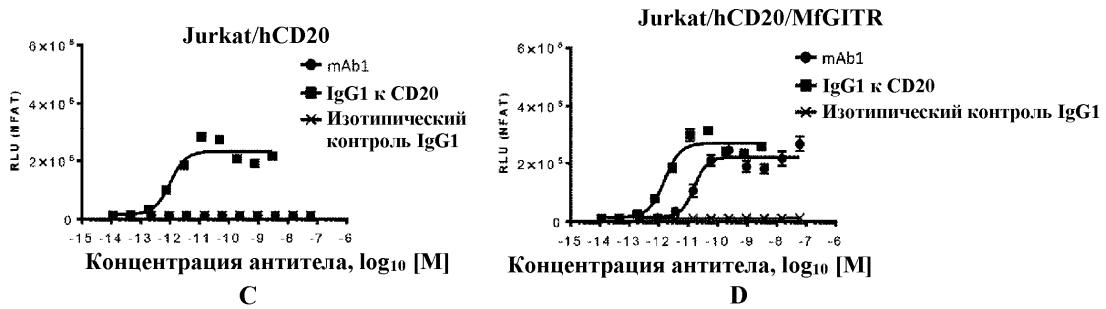
Fc-опосредованная активность NFAT в эффекторных клетках Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a и Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a

Клетки Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a в присутствии



Фиг. 8А-В

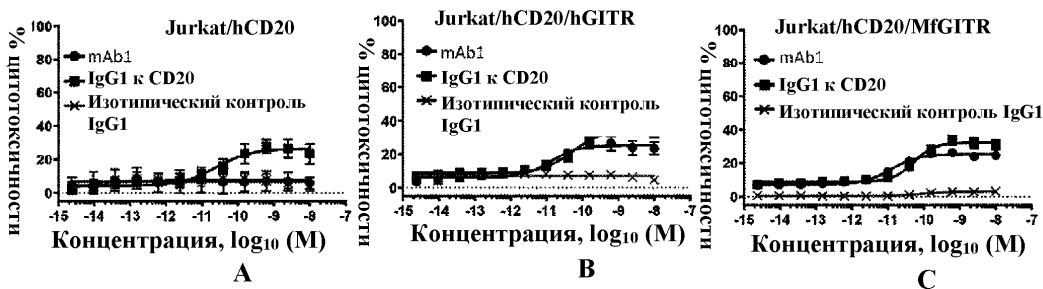
Клетки Jurkat/NFAT-Luc/MfFcγR3a в присутствии



Фиг. 8С-Д

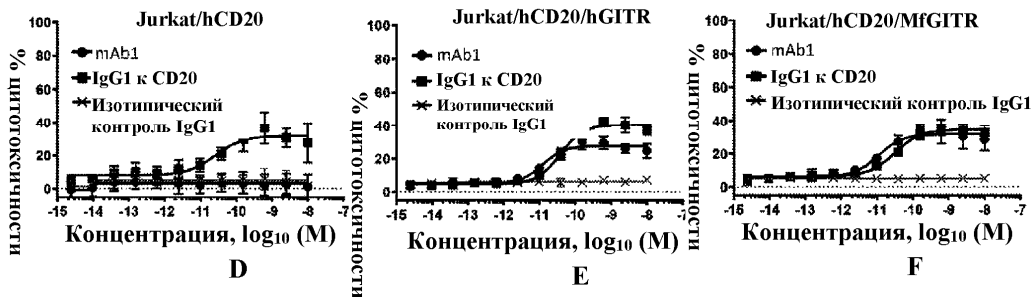
Антителоопосредованная ADCC в отношении Т-клеток Jurkat, сконструированных для экспрессии GITR человека или яванского макака

Человеческие первичные NK-клетки от донора 6700R в присутствии



Фиг. 9А-С

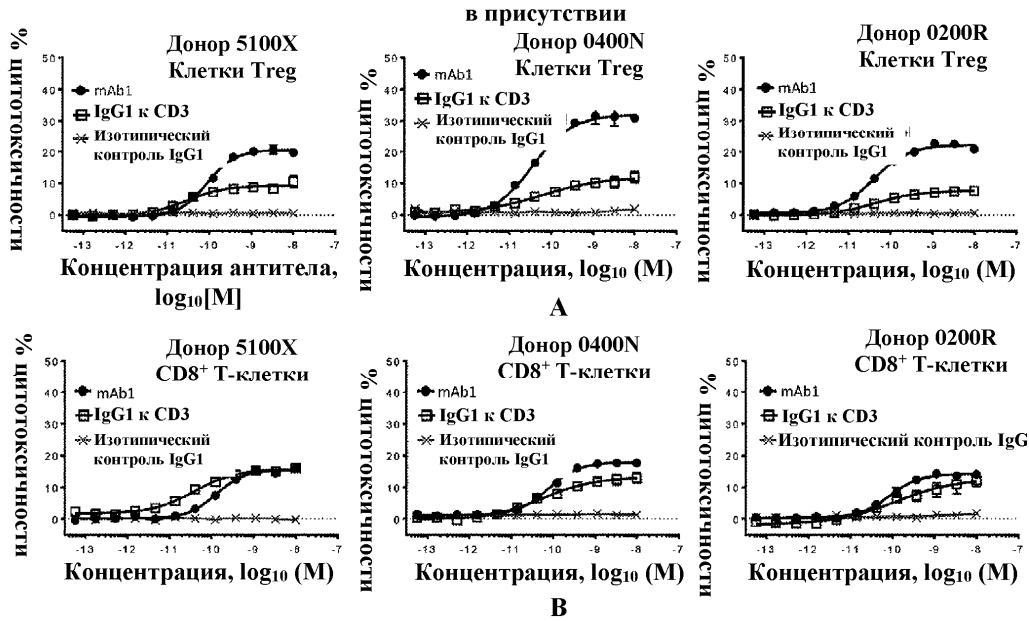
Человеческие первичные NK-клетки от донора 6500V в присутствии



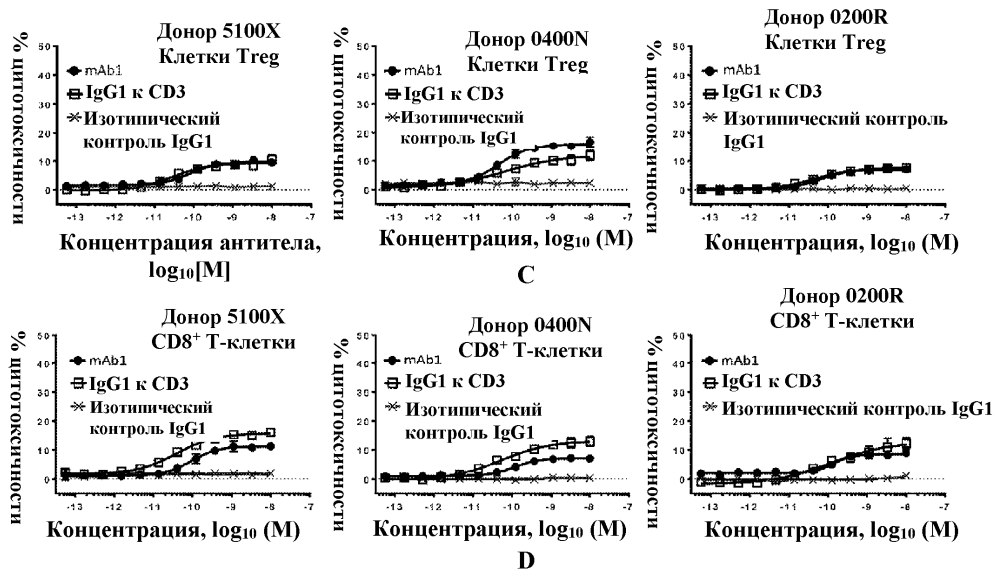
Фиг. 9D-Ф

Опосредованность антителами ADCC в отношении
человеческих первичных Т-клеток

Человеческие первичные NK-клетки от донора 04003

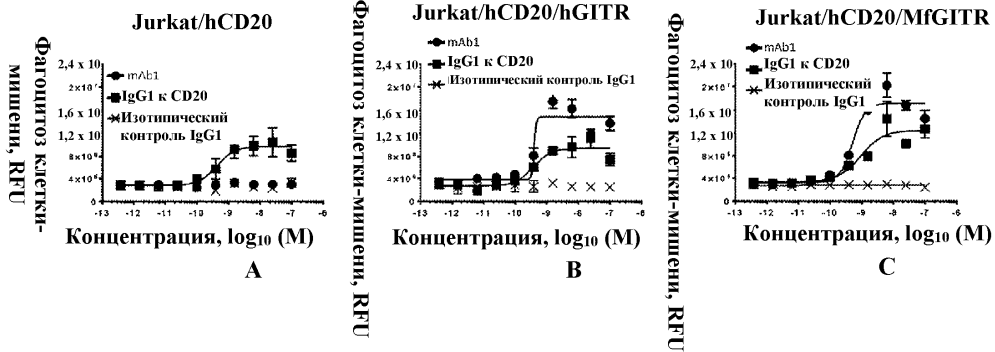


Человеческие первичные NK-клетки от донора 05100 в присутствии

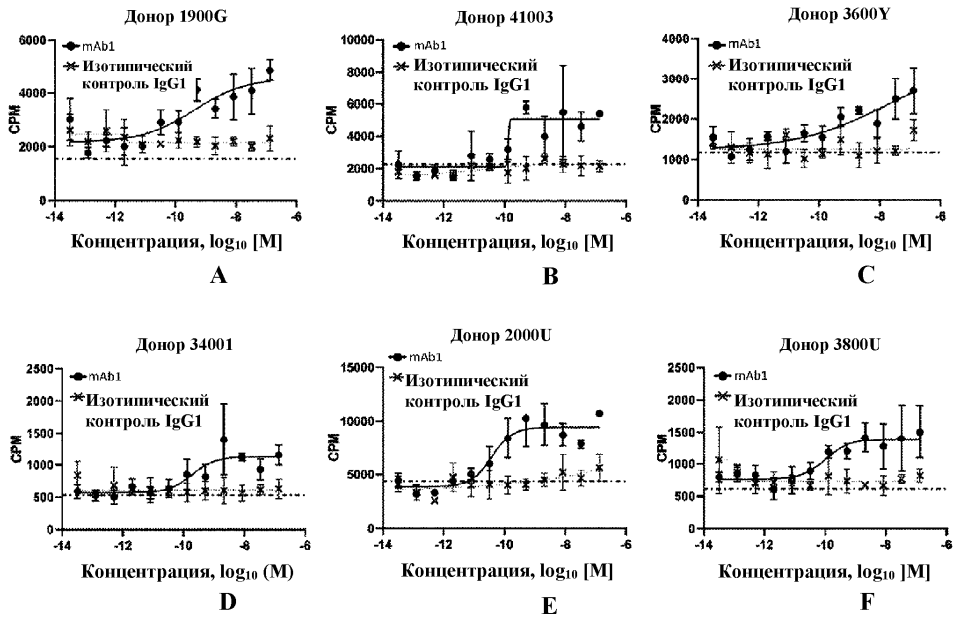


Фиг. 10А-D

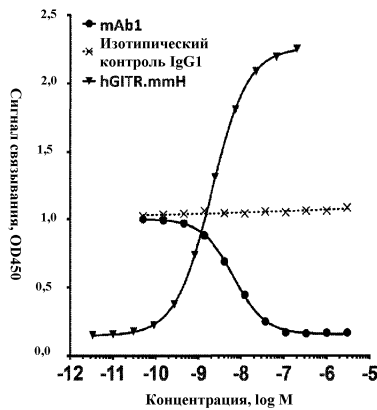
Антителоопосредованная ADCP в отношении Т-клеток Jurkat, сконструированных для экспрессии GITR человека или яванского макака

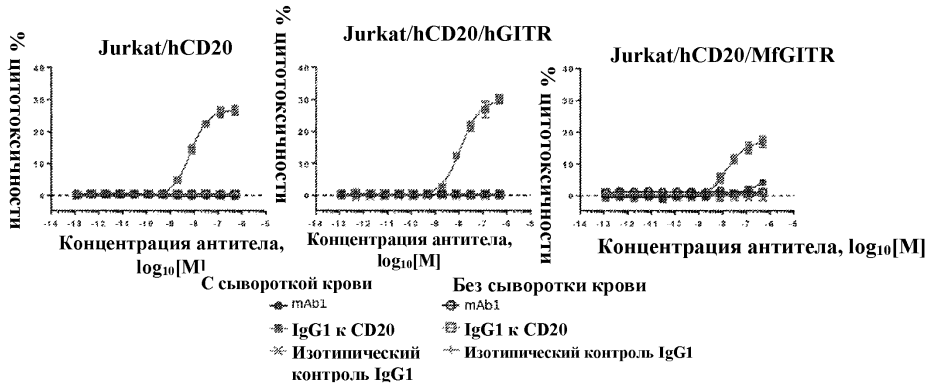


Влияние антитела на пролиферацию первичных CD4⁺ Т-клеток, опосредованную антителом к CD3



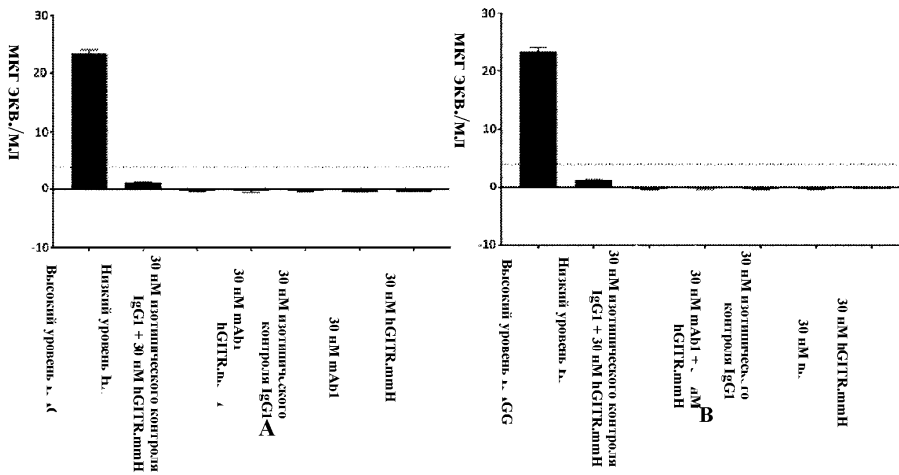
Влияние антитела к GITR на связывание GITR с человеческим GITR-L





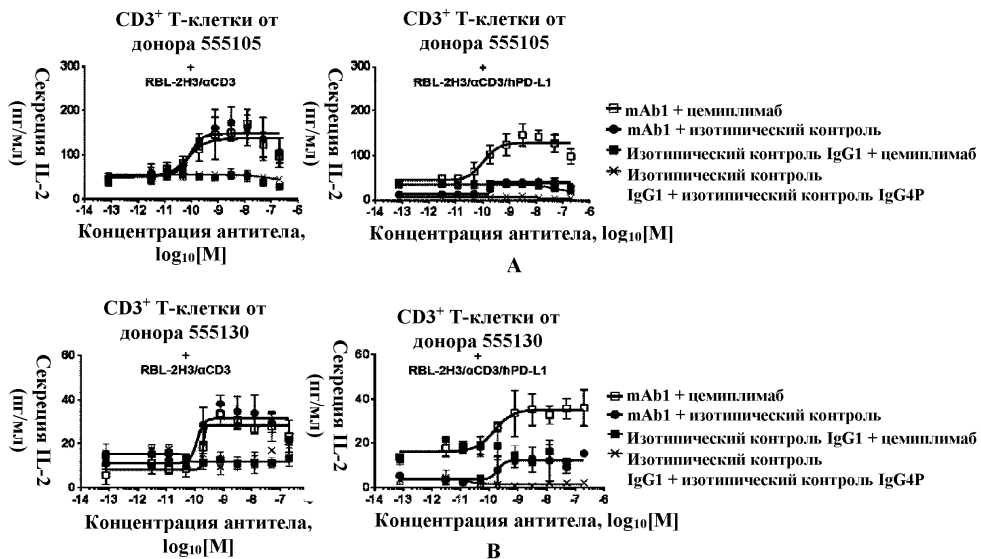
Фиг. 14

mAb1 не образует иммунные комплексы, способные связывать C1q при инкубации с растворимым GITR



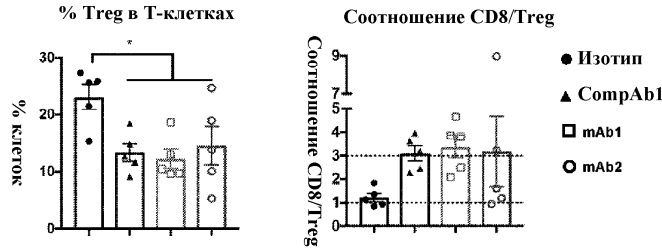
Фиг. 15А-В

mAb1 в комбинации с цемплимабом усиливает секрецию IL-2 первичными CD3⁺ Т-клетками, стимулированными антителом к CD3, в присутствии человеческого PD-L1



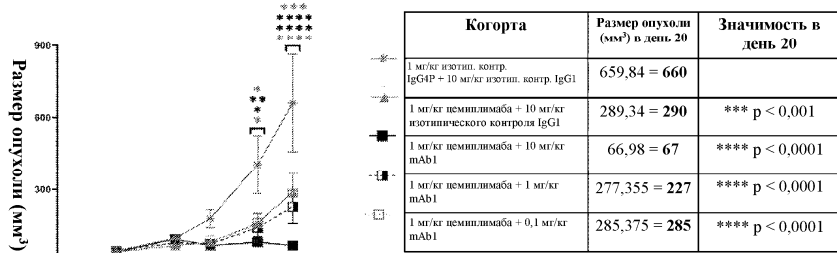
Фиг. 16А-В

Варианты, ассоциированные с антителами к GITR, ComrAb1, обеспечивают истощение внутриопухолевых регуляторных Т-клеток и увеличивают соотношение CD8+ Т-клетки/регуляторные Т-клетки



Фиг. 17

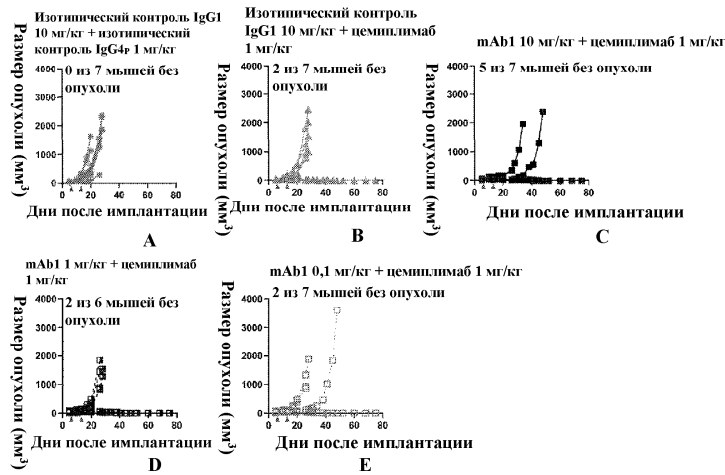
Введение 1 мг/кг цемиплимаба в комбинации с 10 мг/кг mAb1 приводит в результате к значительно повышенному снижению роста опухоли MC38 по сравнению с монотерапией цемиплимабом



Статистическую значимость определяли с использованием двухфакторного RM ANOVA с последующим апостериорным критерием множественных сравнений Тьюки ($\alpha = 0,05$). Символом «*» указана статистическая значимость в сравнении с группой обработки 1 мг/кг изотипического контроля IgG4P + 10 мг/кг изотипического контроля IgG1. Увеличение числа символов представляет возрастающую значимость: 1x = скорректированное p < 0,05; 2x = скорректированное p < 0,01; 3x = скорректированное p < 0,001; 4x = скорректированное p < 0,0001. Введения доз показаны красными стрелками вдоль оси x.

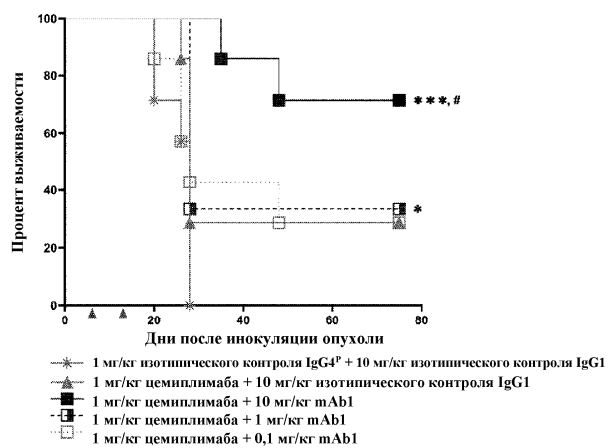
Фиг. 18

Введение 1 мг/кг цемиплимаба в комбинации с 10 мг/кг mAb1 приводит в результате к более высокой частоте клиренса опухолевых клеток по сравнению с монотерапией цемиплимабом в дозе 1 мг/кг



Фиг. 19А-Е

Введение 1 мг/кг цемиплимаба в комбинации с 10 мг/кг mAb1 приводит в результате к значительно более высокой выживаемости по сравнению с монотерапией цемиплимабом



Фиг. 20

