



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005140279/13, 24.05.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.05.2004(30) Конвенционный приоритет:
23.05.2003 US 60/472,844
26.02.2004 US 60/547,975

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2006

(45) Опубликовано: 10.10.2009 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: SHIMIZU JUN et al.: "Stimulation of CD25+
CD4+ regulatory T Cell through GITR breaks
immunological self-tolerance" Nature Immunology,
vol.3, no 2, Feb. 2002, abstract. DATABASE
EMBL 'Online! EBI XP002307885 retrieved from
EBI Database accession no. AY234223 abstract.
«Биология», книга 1. - М.: «Высшая
школа» 1997, с.71-83. RU (см. прод.)(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 23.12.2005(86) Заявка РСТ:
US 2004/016381 (24.05.2004)(87) Публикация РСТ:
WO 2004/107618 (09.12.2004)Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

КОЛЛИНЗ Мэри (US),
ШЕВАЧ Этан Менахем (US),
МАКХЬЮ Ребекка Сьюзн (US),
УИТТЕРС Мэттью Джеймс (US),
ЯНГ Дебора Энн (US),
БИРН Майкл Чэпмен (US),
РЕДДИ Падмалата Ф. (US),
СТЕФЕНЗ Джоффри Лоренс (US),
КАРРЕНО Беатриз М. (US)

(73) Патентообладатель(и):

УАЙТ (US),
ДЗЕ ГАВЕРМЕНТ ОФ ДЗЕ ЮНАЙТЕД
СТЕЙТС ОФ АМЕРИКА эз репрезентед
бай ДЗЕ СЕКРЕТЭРИ ОФ ДЗЕ
ДЕПАРТМЕНТ ОФ ХЕЛТ ЭНД ХЬЮМЭН
СЕРВИСИЗ (US)(54) ЛИГАНД GITR И СВЯЗАННЫЕ С ЛИГАНДОМ GITR МОЛЕКУЛЫ И АНТИТЕЛА И
ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

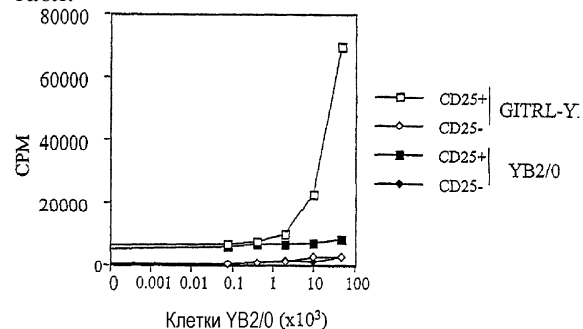
(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
Описан способ лечения субъекта при риске или
поставленном диагнозе аутоиммунного
заболевания, воспалительного заболевания или
отторжения трансплантата, включающий
введение субъекту антагониста GITR, в

котором антагонист GITR предотвращает
связывание GITRL с GITR на эффекторных
Т-клетках. Раскрыт способ ингибирования
пролиферации популяции клеток, содержащей
эффекторные Т-клетки, включающий введение
в клеточную популяцию антагониста GITR, в
котором антагонист GITR предотвращает

связывание GITRL с GITR на эффекторных Т-клетках. Предложен способ супрессии клеточной популяции, содержащей эффекторные Т-клетки, в присутствии $CD4^+CD25^+$ регуляторных Т-клеток, включающий введение в клеточную популяцию антагониста GITR, в котором антагонист GITR предотвращает связывание GITRL с GITR на эффекторных Т-клетках. Описана фармацевтическая композиция, содержащая антагонист GITR и фармацевтически приемлемый носитель для лечения аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, в которой антагонист GITR предотвращает связывание GITRL с GITR на

эффекторных Т-клетках. Изобретение может быть использовано при лечении нарушений, возникающих в результате разрегулированных иммунных реакций. 8 н. и 8 з.п. ф-лы, 14 ил., 3 табл.



ФИГ.2 В

(56) (продолжение):

2196770 С2, 20.01.2003. БАЛАЯН М.С., МИХАЙЛОВ М.И. Вирусные гепатиты. Энциклопедический словарь (Второе издание) М.: Амипресс, 1999.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)*A61P 37/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005140279/13, 24.05.2004**(24) Effective date for property rights:
24.05.2004(30) Priority:
23.05.2003 US 60/472,844
26.02.2004 US 60/547,975(43) Application published: **10.06.2006**(45) Date of publication: **10.10.2009 Bull. 28**(85) Commencement of national phase: **23.12.2005**(86) PCT application:
US 2004/016381 (24.05.2004)(87) PCT publication:
WO 2004/107618 (09.12.2004)Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517

(72) Inventor(s):

KOLLINZ Mehri (US),
ShEVACH Ehtan Menakhem (US),
MAKKh'Ju Rebekka S'juzn (US),
UITTERS Meht't'ju Dzhejms (US),
JaNG Debora Ehnn (US),
BIRN Majkl Chehpmen (US),
REDDI Padmalata F. (US),
STEFENZ Dzhoffri Lorens (US),
KARRENO Beatriz M. (US)

(73) Proprietor(s):

UAJT (US),
DZE GAVERMENT OF DZE JuNAJTED
STEJTS OF AMERIKA ehz represented baj DZE
SEKRETEhRI OF DZE DEPARTMENT OF
KhELT EhND Kh'JuMEhN SERVISIZ (US)**(54) LIGAND GITR AND MOLECULES AND ANTIBODIES BOUND WITH LIGAND GITR, AND VERSIONS OF THEIR APPLICATION**

(57) Abstract:

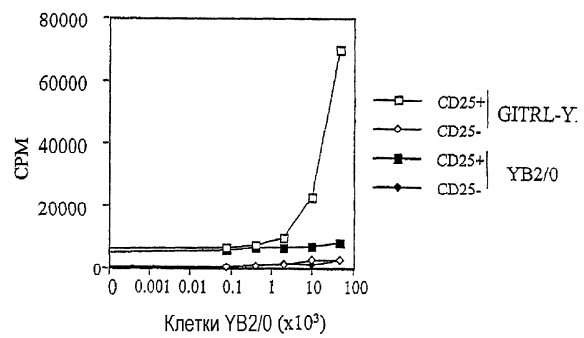
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: according to the invention there is provided method of person's treatment in case of risk or made diagnosis of autoimmune disease or transplantate rejection, including antagonist GITR injection into the person, where antagonist prevents binding GITRL with GITR on excitatory T-cells. There is provided method of cell population proliferation inhibition, containing excitatory T-cells, including injection of antagonist GITR into the cell population, where antagonist prevents binding GITRL with GITR on excitatory T-cells. There is proposed the method of cell population suppression, containing excitatory T-cells, in the

presence of CD4⁺ CD25⁺ suppressor cells, including injection of antagonist GITR into the cell population, where antagonist GITR prevents binding GITRL with GITR on excitatory T-cells. There is provided pharmaceutical composition, containing antagonist GITR and pharmaceutically acceptable carrier for autoimmune disorder treatment, inflammatory diseases and transplantate rejection, where antagonist GITR prevents binding GITRL with GITR on excitatory T-cells.

EFFECT: invention can be applied for treatment of disorders, appearing in the result of disarranged immune reactions.

16 cl, 33 dwg, 3 tbl, 16 ex



ФИГ.2 В

RU 2369636 C2

RU 2369636 C2

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США номер 60/472844, поданной 23 мая 2003 г., и предварительной заявки на патент США номер 60/547975, поданной 26 февраля 2004 г., включенных в данное описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

Данное изобретение проведено при правительственной поддержке в рамках NIH Intramural Research Project #Z01-AI-000224. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Уровень техники изобретения

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым способам диагностики, прогнозирования, мониторинга прогресса и лечения нарушений, происходящих из-за нарушенной иммунной системы (например, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и отторжение трансплантата, и злокачественные опухоли, и инфекционные заболевания), связанных с индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) и лигандом, ассоциированным с GITR (GITRL), и со связанными с ними модуляторами. Настоящее изобретение далее относится к новым терапевтическим средствам и терапевтическим мишеням и к способу скрининга и оценки тестируемых соединений на предмет вмешательства (лечения) и предотвращения нарушений, происходящих от нарушенной регуляции иммунной системы, что связано с GITR и GITRL.

Уровень техники

В общем, Т-лимфоциты ответственны за клеточно-опосредованный иммунитет и играют регуляторную роль путем усиления или подавления ответов других лейкоцитов. Существует представление о том, что Т-лимфоциты играют роль в подавлении иммунных реакций (см., например, Gershon et al. (1970) Immunology 18: 723-35). Однако антигены-мишени для данных супрессорных клеток и механизмы, контролируемые их функцию, пока являются объектами исследования.

Одна из популяций регуляторных Т-клеток, которая генерируется в тимусе, отличается от эффекторных Т-клеток экспрессией уникальных мембранных антигенов. Данные регуляторные Т-клетки составляют субпопуляцию CD4⁺ Т-клеток (т.е. Т-клеток, которые экспрессируют CD4-антиген), которые совместно экспрессируют CD25-антиген. CD25 также известен как α -цепь рецептора интерлейкина-2 (IL-2R). Совместный перенос или реконституция в Т-клетки CD25⁺ ассоциированы с предотвращением воспалительных повреждений и аутоиммунитета у различных экспериментальных животных (см. Shevach (2000) Ann. Rev. Immunol. 18: 423-49 и приведенные там ссылки). CD4⁺CD25⁺ Т-клетки также ассоциированы с ингибированием активации Т-клеток in vitro и адаптивного подавления CD4⁺CD25⁻ Т-клеток в совместной культуре (Shevach, выше).

Более двух десятилетий назад было продемонстрировано, что аутореактивные Т-клетки избегают механизмов центральной толерантности и существуют на периферии под контролем регуляторных Т-клеток тимусного происхождения. В 1995 г. Sakaguchi и его коллеги продемонстрировали, что малая популяция CD4⁺ Т-клеток, которые в природе экспрессируют α -цепь IL-2R (т.е. CD25), вовлечена в контроль органоспецифических аутореактивных Т-клеток (Sakaguchi et al. (1995) J. Immunol. 155: 1151-64). Конкретно они продемонстрировали, что перенос CD4⁺CD25⁻ Т-клеток иммунодефицитным хозяевам вызывает спектр аутоиммунных реакций, которые могут предотвращаться совместным переносом CD4⁺CD25⁺ Т-клеток (Sakaguchi et al.,

выше). Последующие исследования связали CD4⁺CD25⁺ регуляторные Т-клетки с подавлением иммунных реакций на вирусные, бактериальные и протозойные инфекции (Aseffa et al. (2002) *J. Immunol.* 169:3232-41; Belkaid et al. (2002) *Nature* 420: 502-07; Hisaeda et al. (2004) *Nat. Med.* 10:29-30; Kursar et al. (2002) *J. Exp. Med.* 196:1585-92; 5 Lundgren et al. (2003) *Infect. Immun.* 71:1755-62; Maloy et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:111-19).

Вместе данные исследования предоставили доказательство того, что удаление CD4⁺CD25⁺ Т-клеток усилило иммунный ответ. Сделано много попыток для определения активации и супрессии данными CD4⁺CD25⁺ Т-клетками. Данные клетки 10 представляют собой уникальную родословную клеток тимусного происхождения, которые мощно подавляют эффекторную функцию Т-клеток *in vitro* и *in vivo*.

В некоторых исследованиях *in vitro* выявлено, что CD4⁺CD25⁺ клетки подавляют пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в ответ и на митогены, и антигены путем выключения 15 транскрипции IL-2 (например, Thornton and Shevach (1998) *J. Exp. Med.* 188:287-96; Takahashi et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:1969-80). Совместного переноса CD4⁺CD25⁺ Т-клеток *in vivo* с аутореактивными CD4⁺ Т-клетками достаточно для подавления индукции и эффекторной фазы органоспецифического аутоиммунитета (Suri-Payer et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:669-77; Suri-Payer et al. (1998) *J. Immunol.* 160:1212-18). 20

Другие свойства CD4⁺CD25⁺ Т-клеток включают в себя слабую реакционную способность в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора (TCR) в отсутствие экзогенного IL-2, иммуносупрессию путем межклеточного взаимодействия и 25 необходимость в передаче сигнала с TCR для индукции их супрессорного фенотипа (однако, если они активируются, их супрессорная функция независима от антигенного стимула). Также продемонстрировано, что само приобретение экспрессии CD25, которое может достигаться стимуляцией CD4⁺CD25⁻ Т-клеток, не индуцирует супрессорного фенотипа. Известно, что данные CD4⁺CD25⁺ Т-клетки существуют у 30 людей (Shevach (2001) *J. Exp. Med.* 193:F1-F6).

В одном из исследований продемонстрировано, что для генерирования регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток требуется измененная селекция в тимусе (Jordan et al. (2001) *Nat. Immunol.* 2:301-06). Кроме того, в исследованиях с нокаут-мышами 35 продемонстрировано, что молекулы, вовлеченные в синтез и реакционную способность IL-2, требуются для генерирования данных клеток; мыши, генетически дефицитные по IL2, или IL2R β , или по B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86), или по CD28, все характеризуются сильным снижением количества CD4⁺CD25⁺ клеток, и в результате этого лимфаденопатией и гиперпролиферацией периферии у некоторых из данных 40 мышей (Papiernik et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:371-78; Salomon et al. (2000) *Immunity* 12: 431-40; Kumanogoh et al. (2001) *J. Immunol.* 166:353-60).

До недавнего времени в данной области не удавалось определить механизмы, вовлеченные в опосредованное CD4⁺CD25⁺ подавление иммунной системы, например 45 антигенная специфичность, молекулы, вовлеченные в приобретение подавления, и молекулы клеточной поверхности или короткодействующие цитокины, вовлеченные в эффекторную фазу подавления; молекулярные мишени CD25⁺ Т-клеток, используемые при модулировании аутоиммунитета, также оставались большей частью неизвестными. В настоящее время было продемонстрировано, путем оценки 50 дифференциальной экспрессии генов с использованием анализа генных чипов на CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ Т-клетках, что существуют некоторые дифференциальные зависимые от CD25⁺ гены (McHugh et al. (2002) *Immunity* 16:311-23; см. также заявку на

патент США 10/194754, включенную в данное описание во всей своей полноте в качестве ссылки). Данные гены, которые, как было определено, преимущественно экспрессируются в CD4⁺CD25⁺ Т-клетках, могут служить мишенями для терапевтического воздействия и способов скрининга аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, а также злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний.

Значимо то, что один из генов, который, как было определено, дифференциально экспрессировался в CD25⁺ клетках, является индуцируемым глюкокортикоидами TNF-рецептором (GITR) (McHugh et al., выше). GITR, трансмембранный белковый рецептор клеточной поверхности, является представителем надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR). Как было продемонстрировано, GITR конститутивно присутствует на неактивированных Т-клетках (Gavin et al. (2002) Nat. Immunol. 3:33-41; McHugh et al., выше; Shimizu et al. (2002) Nat. Immunol. 3:135-42). GITR связывается с другим трансмембранным белком, называемым лиганд GITR (GITRL). Антитела-агонисты GITR, как было показано, отменяют супрессорную активность CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, что демонстрирует функциональную роль GITR в регуляции активности данных клеток (McHugh et al., выше). Другое исследование подтвердило, что стимуляция GITR специфичным моноклональным антителом отменяла опосредованную CD4⁺CD25⁺ Т-клетками супрессию, с индукцией таким образом аутоиммунитета (Shimizu et al., выше). Данные исследования ведут к предположению, что GITR является более надежным маркером CD4⁺CD25⁺ Т-клеток (Uraushihara et al. (2003) J. Immunol. 171:708-16); однако не только экспрессия GITR характерна для этой субпопуляции, поскольку положительная регуляция GITR также происходит после активации CD4⁺CD25⁻ Т-клеток (McHugh et al., выше; Shimizu et al., выше).

Поскольку GITR, как было показано, значим при регуляции супрессорной активности CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в отношении CD4⁺CD25⁻ Т-клеток, требуется идентифицировать и охарактеризовать новые молекулы, которые взаимодействуют с GITR. Такие новые молекулы, которые взаимодействуют с GITR, описаны в данном описании. Кроме того, предоставлены модуляторы данных молекул.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к нуклеотидной и аминокислотной последовательностям нового мышинового гомолога человеческого GITRL. Настоящее изобретение также относится к антителам против мышинового GITRL. Настоящее изобретение также относится к способам как отмены иммуносупрессии путем индукции агонистического связывания GITR-GITRL, так и восстановления или усиления иммуносупрессии путем ингибирования связывания GITR-GITRL, например, путем применения нейтрализующих антител, которые ингибируют активность GITRL (например, которые блокируют взаимодействие между GITR и GITRL). Такая отмена или восстановление/усиление иммуносупрессии благоприятно для лечения различных нарушений, возникающих в результате разрегулированных иммунных реакций, например аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, и злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний. Способы по настоящему изобретению направлены на манипулирование GITRL и GITR, включая, но без ограничения, мышинный GITRL и GITR и их гомологи; в состав данных гомологов специфично включен человеческий GITRL и человеческий GITR.

Настоящее изобретение относится к новым выделенным и очищенным

полинуклеотидам и полипептидам, относящимся к новому лиганду GITR (GITRL).
 Изобретение также относится к антителам против GITRL, а также к способам лечения,
 диагностики, прогнозирования и мониторинга прогресса аутоиммунных нарушений,
 воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата и злокачественных
 5 опухолей и инфекционных заболеваний. В одном из вариантов осуществления
 изобретения описанные способы и молекулы могут применяться для манипуляции
 исходом иммунного ответа во время лечения заболевания или нарушения, включая
 аутоиммунные нарушения, воспалительные заболевания и отторжение трансплантата
 10 и злокачественные опухоли и инфекционные заболевания. В другом варианте
 осуществления описанные полинуклеотиды и полипептиды по изобретению,
 блокирующие или ингибирующие взаимодействие между GITR и GITRL, например,
 путем отрицательной регуляции экспрессии или активности GITRL или путем
 связывания с GITRL, но не индуцирующие передачу сигнала с GITR, могут
 15 применяться для отмены или усиления супрессии иммунной системы. В другом
 варианте осуществления взаимодействие между GITR и GITRL может блокироваться
 или ингибироваться малой молекулой. Специалисту в данной области будет очевидно,
 что данные типы регуляции (т.е. данные варианты осуществления) являются наиболее
 20 благоприятными для лечения аутоиммунных нарушений и некоторых воспалительных
 заболеваний и сходных или связанных нарушений, а также для лечения отторжения
 трансплантата. В другом варианте осуществления описанные полинуклеотиды и
 полипептиды по изобретению, которые индуцируют передачу сигнала с GITR,
 например, путем положительной регуляции экспрессии или активности GITRL или
 25 путем агонистического связывания с GITR, могут использоваться для обращения,
 блокирования или отмены супрессии иммунной системы. В другом варианте
 осуществления взаимодействие между GITR и GITRL может усиливаться или
 имитироваться малой молекулой. Специалисту в данной области будет очевидно, что
 30 данные типы регуляции являются наиболее благоприятными для лечения
 злокачественных опухолей и подобных заболеваний, а также инфекционных
 заболеваний. Специалисту в данной области также известны вероятные преимущества
 комбинации данных новых способов лечения с общепринятыми и другими способами
 лечения.

35 В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенной молекуле
 нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1
 или SEQ ID NO:3. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты
 функционально связана, по меньшей мере, с одной последовательностью контроля
 40 экспрессии. В другом варианте осуществления предоставляется клетка-хозяин,
 трансформированная или трансфицированная данной молекулой нуклеиновой
 кислоты.

В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному
 аллелю SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3. В другом варианте осуществления изобретение
 45 относится к выделенному гену, включающему в себя нуклеотидную
 последовательность SEQ ID NO:3.

В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенной молекуле
 нуклеиновой кислоты, которая специфично гибридизуется в условиях высокой
 50 жесткости с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:1 или SEQ
 ID NO:3, или с комплементарной ей последовательностью.

В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенной молекуле
 нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:2 или ее фрагмент, который кодирует активный фрагмент белка. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты или ее фрагмент функционально связаны, по меньшей мере, с одной последовательностью контроля экспрессии. В другом варианте осуществления предоставляется клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, функционально связанной, по меньшей мере, с одной последовательностью контроля экспрессии. В другом варианте осуществления изобретение относится к не относящемуся к человеку трансгенному животному, в котором соматические и зародышевые клетки содержат данную выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или ее фрагмент. В другом варианте осуществления изобретение относится к не относящемуся к человеку трансгенному животному, в котором соматические и зародышевые клетки содержат ДНК, включающую в себя нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3.

В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному белку, содержащему аминокислотную последовательность, кодируемую выделенной нуклеиновой кислотой, которая специфично гибридизуется в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, или с комплементарной ей последовательностью. В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному белку, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или ее активный фрагмент.

В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, или ее фрагмент, где экспрессия данной нуклеиновой кислоты в клетке приводит к сниженной продукции GITRL. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты или ее фрагмент функционально связаны, по меньшей мере, с одной последовательностью контроля экспрессии. В другом варианте осуществления предоставляется клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная данной выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или ее фрагментом, функционально связанной, по меньшей мере, с одной последовательностью контроля экспрессии. В другом варианте осуществления изобретение относится к не относящемуся к человеку трансгенному животному, в котором соматические и зародышевые клетки содержат данную выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или ее фрагмент.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, комплементарному мРНК, соответствующей молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3 или ее фрагмент, где олигонуклеотид ингибирует экспрессию GITRL. В другом варианте осуществления изобретение относится к молекуле siРНК (короткой интерферирующей РНК), соответствующей молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3 или ее фрагмент, где молекула siРНК ингибирует экспрессию GITRL.

В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу, способному к специфичному связыванию выделенного белка, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую выделенной нуклеиновой кислотой, которая специфично гибридизуется в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, или с комплементарной ей последовательностью. В другом варианте осуществления

антитело нейтрализует активность GITRL. В другом варианте осуществления антитело представляет собой 5F1, имеющее номер ATCC PTA-5336, или 10F12, имеющее номер ATCC PTA-5337. В другом варианте осуществления антитело включает в себя антигенсвязывающие фрагменты 5F1 или 10F12. В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу, способному специфично связывать выделенный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или ее активный фрагмент. В другом варианте осуществления антитело нейтрализует активность GITRL. В другом варианте осуществления антитело представляет собой 5F1, имеющее номер ATCC PTA-5336, или 10F12, имеющее номер ATCC PTA-5337. В другом варианте осуществления антитело содержит антигенсвязывающие фрагменты 5F1 или 10F12.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу скрининга тестируемых соединений, способных ингибировать или блокировать взаимодействие GITRL с GITR, включающему стадии контакта образца, содержащего GITRL и GITR, с тестируемым соединением, и определения того, снижено ли взаимодействие GITRL с GITR в образце по сравнению с взаимодействием GITRL с GITR в образце, не контактировавшем с данным соединением, за счет чего снижение взаимодействия GITRL с GITR в образце, контактировавшем с данным соединением, идентифицирует соединение как то, которое ингибирует или блокирует взаимодействие GITRL с GITR. В другом варианте осуществления идентифицированное соединение применяют в способе лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или отторжения трансплантата, причем данный способ включает стадии выделения из субъекта Т-клеток, обработки выделенных Т-клеток идентифицированным соединением и переноса Т-клеток обратно субъекту. В другом варианте осуществления идентифицированное соединение применяют в способе лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или отторжения трансплантата, причем данный способ включает введение субъекту идентифицированного соединения. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу оценки у субъекта эффективности идентифицированного соединения, включающему стадии выявления первого количества эффекторных Т-клеток у субъекта перед введением субъекту данного соединения, выявления второго числа эффекторных Т-клеток у субъекта после введения субъекту данного соединения и сравнения первого количества и второго количества, причем значимое снижение второго значения количества эффекторных Т-клеток по сравнению с первым значением указывает на то, что данное соединение эффективно при лечении у субъекта аутоиммунного нарушения, воспалительного заболевания или отторжения трансплантата. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют собой CD4⁺ Т-клетки или CD8⁺ Т-клетки.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу скрининга тестируемых соединений, способных усиливать или имитировать взаимодействие GITRL с GITR, включающему стадии контакта образца, содержащего GITRL и GITR, с тестируемым соединением и определения того, повышается ли взаимодействие GITRL с GITR в образце по сравнению с взаимодействием GITRL с GITR в образце, не контактировавшем с данным соединением, за счет чего такое повышение взаимодействия GITRL с GITR в образце, контактировавшем с данным соединением, идентифицирует данное соединение как то, которое усиливает или имитирует взаимодействие GITRL с GITR. В другом варианте

осуществления идентифицированное соединение применяют в способе лечения
 субъекта при риске или поставленном диагнозе злокачественной опухоли или
 инфекционного заболевания, причем данный способ включает стадии выделения из
 субъекта Т-клеток, обработки выделенных Т-клеток идентифицированным
 соединением и переноса Т-клеток обратно субъекту. В другом варианте
 осуществления идентифицированное соединение применяют в способе лечения
 субъекта при риске или поставленном диагнозе злокачественной опухоли или
 инфекционного заболевания, причем данный способ включает введение субъекту
 идентифицированного соединения. В другом варианте осуществления изобретение
 относится к способу оценки у субъекта эффективности идентифицированного
 соединения, включающему стадии выявления первого количества эффекторных
 Т-клеток у субъекта перед введением субъекту данного соединения, выявления
 второго количества эффекторных Т-клеток у субъекта после введения субъекту
 данного соединения и сравнения первого количества и второго количества, причем
 значимое повышение второго значения количества эффекторных Т-клеток по
 сравнению с первым значением указывает на то, что данное соединение эффективно
 при лечении у данного субъекта злокачественной опухоли или инфекционного
 заболевания. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют

собой CD4⁺ Т-клетки или CD8⁺ Т-клетки.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу диагностики у
 субъекта аутоиммунного нарушения, воспалительного заболевания или отторжения
 трансплантата, включающему стадии выявления тестируемого количества продукта
 гена GITRL в образце от субъекта и сравнения тестируемого количества с нормальным
 количеством продукта гена GITRL в контрольном образце, за счет чего тестируемое
 количество, значимо превышающее нормальное количество, предоставляет
 позитивное указание на диагноз аутоиммунного нарушения, воспалительного
 заболевания или отторжения трансплантата. В другом варианте осуществления
 изобретение относится к способу диагностики у субъекта злокачественной опухоли
 или инфекционного заболевания, включающему стадии выявления тестируемого
 количества продукта гена GITRL в образце от субъекта и сравнения тестируемого
 количества с нормальным количеством продукта гена GITRL в контрольном образце,
 причем тестируемое количество, которое значимо ниже нормального количества,
 предоставляет позитивное указание на диагноз злокачественной опухоли или
 инфекционного заболевания.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения
 субъекта при риске или поставленном диагнозе аутоиммунного заболевания,
 воспалительного заболевания или отторжения трансплантата, включающему введение
 субъекту антагониста GATR. В другом варианте осуществления способ относится к
 введению антагониста GATR, так что поддерживается чувствительность
 эффекторных Т-клеток у субъекта к подавлению CD4⁺CD25⁺ регуляторными
 Т-клетками (например, в количестве, эффективном для сохранении такой
 чувствительности). В другом варианте осуществления антагонист GATR выбран из
 группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего
 антитела против GATR, слитого белка, содержащего GATR, слитого белка, содержащего
 активный фрагмент GATR, низкомолекулярного антагониста, антисмысловой в
 отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой
 кислоты siPHK против GITRL. В другом варианте осуществления аутоиммунное
 нарушение или воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из

ревматоидного артрита, энцефаломиелимита, остеоартрита, рассеянного склероза, аутоиммунного гастрита, системной красной волчанки, псориаза и других воспалительных дерматозов, диабета I типа, астмы, аллергии и воспалительных заболеваний толстого кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, включающему введение субъекту агониста GITR. В другом варианте осуществления способ включает введение агониста GITR, так что агонист GITR предоставляет костимуляторный сигнал эффекторным Т-клеткам у субъекта и делает их менее чувствительными к подавлению $CD4^+CD25^+$ регуляторными Т-клетками субъекта (например, в количестве, эффективном для предоставления такого сигнала). В другом варианте осуществления агонист GITR выбран из группы, состоящей из GITRL, активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITRL, и агонистического в отношении GITR антитела.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу индукции пролиферации популяции клеток, содержащей эффекторные Т-клетки, включающему введение в клеточную популяцию агониста GITR. В другом варианте осуществления агонист GITR выбран из группы, состоящей из GITRL, активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITRL, и агонистического в отношении GITR антитела. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют собой $CD4^+$ Т-клетки или $CD8^+$ Т-клетки.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования пролиферации популяции клеток, содержащей эффекторные Т-клетки, включающему введение в клеточную популяцию антагониста GITR. В другом варианте осуществления антагонист GITR выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, низкомолекулярного антагониста, антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siРНК против GITRL. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют собой $CD4^+$ Т-клетки или $CD8^+$ Т-клетки. В другом варианте осуществления антагонист GITR представляет собой 5F1 или 10F12.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования или блокирования супрессии клеточной популяции, содержащей эффекторные Т-клетки, в присутствии $CD4^+CD25^+$ регуляторных Т-клеток, включающему введение в клеточную популяцию агониста GITR. В другом варианте осуществления способ включает введение агониста GITR, так что агонист GITR предоставляет костимуляторный сигнал эффекторным Т-клеткам у субъекте и делает их менее чувствительными к подавлению $CD4^+CD25^+$ регуляторными Т-клетками субъекта (например, в количестве, эффективном для предоставления такого сигнала). В другом варианте осуществления агонист GITR выбран из группы, состоящей из GITRL, активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITRL, и агонистического в отношении GITR антитела. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют собой $CD4^+$ Т-клетки или $CD8^+$ Т-клетки.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу супрессии клеточной популяции, содержащей эффекторные Т-клетки, в присутствии $CD4^+CD25^+$ регуляторных Т-клеток, включающему введение в клеточную популяцию антагониста GITR. В другом варианте осуществления способ включает введение антагониста GITR, так что поддерживается чувствительность эффекторных Т-клеток к подавлению $CD4^+CD25^+$ регуляторными Т-клетками (например, в количестве, эффективном для поддержания такой чувствительности). В другом варианте осуществления антагонист GITR выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, низкомолекулярного антагониста, антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siPHK против GITRL. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют собой $CD4^+$ Т-клетки или $CD8^+$ Т-клетки. В другом варианте осуществления антагонист GITR представляет собой 5F1 или 10F12.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования экспрессии GITRL в популяции клеток, включающему обработку данной популяции клеток выделенной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO:3 или ее фрагменту, где экспрессия данной молекулы нуклеиновой кислоты приводит к сниженной продукции GITRL. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования экспрессии GITRL в популяции клеток, включающему обработку популяции клеток антисмысловым олигонуклеотидом, комплементарным мРНК, соответствующей молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3 или ее фрагмент, где олигонуклеотид ингибирует экспрессию GITRL.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования экспрессии GITRL в популяции клеток, включающему обработку популяции клеток молекулой siPHK, направленной на мРНК, соответствующую молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования экспрессии GITRL в популяции клеток, включающему обработку популяции клеток молекулой siPHK, направленной на мРНК, соответствующую выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования экспрессии GITRL в популяции клеток, включающему обработку популяции клеток антисмысловым нуклеотидом против молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей GITRL. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования экспрессии GITRL в популяции клеток, включающему обработку популяции клеток молекулой siPHK, направленной против мРНК, кодирующей GITRL.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу индукции экспрессии GITRL в популяции клеток, включающему обработку популяции клеток путем трансформации или трансфекции популяции клеток выделенной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, или выделенной молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или ее

фрагмент, который кодирует активный фрагмент белка, где данная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана, по меньшей мере, с одной последовательностью контроля экспрессии.

В другом варианте осуществления изобретение относится к популяции эффекторных Т-клеток, контактировавших *in vitro* или *ex vivo* с агонистом GITR. В другом варианте осуществления агонист GITR выбран из группы, состоящей из GITRL или активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITRL, низкомолекулярного агониста и агонистического в отношении GITR антитела. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют собой CD4⁺ Т-клетки или CD8⁺ Т-клетки.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения у субъекта злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, причем данный способ включает стадии получения популяции эффекторных Т-клеток, обработки данной популяции агонистом GITR и введения обработанной популяции субъекту, пораженному злокачественной опухолью или инфекционным заболеванием. В другом варианте осуществления агонист GITR выбран из группы, состоящей из GITRL, активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITRL, низкомолекулярного агониста и агонистического в отношении GITR антитела. В другом варианте осуществления субъект подвержен злокачественной опухоли, и обработанную популяцию используют в качестве противоопухолевой вакцины.

В другом варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей агонист GITR и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления агонист GITR выбран из группы, состоящей из GITRL, активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITRL, низкомолекулярного агониста и агонистического в отношении GITR антитела.

В другом варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антагонист GITR и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления антагонист GITR выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, низкомолекулярного антагониста, антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siPHK против GITRL. В другом варианте осуществления антитело содержит антигенсвязывающие фрагменты 5F1 или 10F12.

В другом варианте осуществления изобретение относится к вакцинному адъюванту, содержащему агонист GITR и антиген, выбранный из группы, состоящей из вирусного антигена, бактериального антигена, антигена грибов, паразитарного антигена, ракового антигена, ассоциированного с опухолью антигена или их фрагментов. В другом варианте осуществления агонист GITR выбран из группы, состоящей из GITRL, активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITRL, низкомолекулярного агониста и агонистического в отношении GITR антитела.

В другом варианте осуществления изобретение относится к вакцинному адъюванту, содержащему антагонист GITR и антиген, выбранный из группы, состоящей из аутоантигена, белка амилоидного пептида, аллоантигена, антигена трансплантата, аллергена и их фрагментов. В другом варианте осуществления антагонист GITR

выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, низкомолекулярного антагониста, антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siPHK против GITRL. В другом варианте осуществления антитело содержит антигенсвязывающие фрагменты 5F1 или 10F12.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу скрининга тестируемых соединений на способность нейтрализовать активность GITRL, включающему стадии контакта с данным соединением образца, содержащего GITRL и нейтрализующее антитело, и определения того, снижается ли взаимодействие GITRL с нейтрализующим антителом в образце относительно взаимодействия GITRL с нейтрализующим антителом в образце, не контактировавшем с данным соединением, причем снижение взаимодействия GITRL с нейтрализующим антителом в образце, контактировавшем с соединением, идентифицирует соединение как то, которое ингибирует или блокирует взаимодействие GITRL с нейтрализующим антителом. В другом варианте осуществления антитело представляет собой 5F1 или 10F12.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу предоставления костимуляторного сигнала популяции клеток, содержащей эффекторные Т-клетки, причем данный способ включает введение агониста GITR. В другом варианте осуществления агонист GITR представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из GITRL или активного фрагмента GITRL, слитого белка, содержащего GITRL, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, и агонистического антитела против GITR. В другом варианте осуществления эффекторные Т-клетки представляют собой $CD4^+$ Т-клетки или $CD8^+$ Т-клетки.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 показано выравнивание (основанное на матрице аминокислотных замен BLOSUM62; см. Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19) аминокислотных последовательностей мышинового (m) и человеческого (h) GITRL.

На фиг.2 показаны результаты экспериментов по влиянию связывания GITRL:GITR на пролиферацию $CD4^+CD25^+$ Т-клеток. Измеряли включение тимидина (CPM) как средство оценки клеточной пролиферации. На фиг.2А показано, что агонистическое антитело против GITR стимулирует пролиферацию $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, но не $CD4^+CD25^-$ Т-клеток. На фиг.2В показано, что клетки YB2/0, экспрессирующие GITRL, стимулируют пролиферацию $CD4^+CD25^+$ клеток.

На фиг.3А показано, что GITRL, экспрессированный клетками YB2/0 (~50000), а также агонистическое антитело против GITR (2 мкг/мл) отменяют супрессию (т.е. дают отрицательный процент супрессии), продуцируемую выделенными $CD4^+CD25^+$ супрессорными Т-клетками (# супрессоров). На фиг.3В показано, что клетки GITRL-YB2/0 в количествах менее 50000 (т.е. 3000-25000) могли частично отменять супрессию в зависимом от дозы режиме.

На фиг.4 показано, что клетки GITRL-YB2/0 (~50000) не отменяют супрессию, когда вместо свежевыделенных $CD4^+CD25^+$ Т-клеток используют активированные $CD4^+CD25^+$ Т-клетки; сходные результаты получены с агонистическим антителом против GITR.

На фиг.5А и 5В показано, что индуцированная GITRL отмена супрессии, продуцированной свежевыделенными $CD4^+CD25^+$ Т-клетками, может отменяться сама (т.е. происходит восстановление супрессии) в присутствии антитела против GITRL («анти-GITRL»=антитело 5F1). Фиг.5В включает дополнительный эксперимент, где

показано, что контрольное антитело («контрольный Ig») не восстанавливает супрессию.

На фиг.6 показано, что антитело против GITRL может только усиливать супрессию в присутствии $CD4^+CD25^+$ Т-клеток. На фиг.6А показана супрессия пролиферации клеток лимфатических узлов в присутствии антитела против GITRL (5F1). На фиг.6В показано отсутствие супрессорной активности антитела против GITRL, когда популяция клеток лимфоузла лишена $CD4^+CD25^+$ Т-клеток.

На фиг.7 показано распределение клеток, экспрессирующих GITRL, в лимфоидных тканях. Фиг.7А. Анализ проточной цитометрии проводили на $CD11c^+$ клетках, обогащенных посредством магнитных гранул из селезенки мышей BALB/c, путем окрашивания антителами против CD4, против CD8 и против GITRL. Экспрессию GITRL определяли сравнением интенсивности флуоресценции в разделенных субпопуляциях $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD4^-CD8^-$ (верхняя, средняя и нижняя панели гистограмм соответственно), окрашенных антителом против GITRL (закрашенные гистограммы) с интенсивностью флуоресценции данных клеток, окрашенных антителом контроля изотипа (незакрашенные гистограммы). Фиг.7В. Экспрессию GITRL дендритными клетками селезенки (DC) и В-1 В-клетками определяли путем окрашивания свежевыделенных BALB/c $CD11c^+$ DC селезенки (верхняя панель гистограмм) и $CD11c^{low}$ В220⁺ плазмацитоидных DC (нижняя панель гистограмм) mAb против GITRL (закрашенные гистограммы) или антителом контроля изотипа (незакрашенные гистограммы) и проведения анализа проточной цитометрии.

Фиг.7С (верхняя панель гистограмм). Интенсивность флуоресценции В220⁺ В-клеток среди всех спленоцитов (закрашенная гистограмма) и сортированных по $CD11b^+$ В220⁺ перитонеальных (perC) В-1 В-клеток (незакрашенная гистограмма со сплошной линией), окрашенных антителом против GITRL, по сравнению с интенсивностью флуоресценции клеток, окрашенных контролем изотипа (незакрашенная гистограмма с пунктирной линией). Фиг.7С (нижняя панель гистограмм). Показано сравнение интенсивности флуоресценции окрашенных антителом против GITRL (закрашенная гистограмма) и окрашенных антителом против изотипа (незакрашенная гистограмма) макрофагов perC ($CD11b^+$ В220⁻ клетки). Фиг.7D. Тимоциты окрашивали на предмет экспрессии CD4, CD8 и GITRL или контроля изотипа. Интенсивность флуоресценции клеток $CD4^+CD8^-$ (верхний левый квадрант), $CD4^+CD8^+$ (верхний правый квадрант) и $CD4^-CD8^+$ (верхний правый квадрант), окрашенных антителом против GITRL (закрашенная гистограмма), сравнивали с интенсивностью флуоресценции данных клеток, окрашенных антителом контроля изотипа (незакрашенная гистограмма). Фиг.7Е. Экспрессию GITRL сортированными $CD44^+CD25^-$ (R1), $CD44^+CD25^+$ (R2), $CD44^-CD25^+$ (R3) или $CD44^-CD25^-$ (R4) тимусными предшественниками определяли сравнением флуоресценции данных клеток, окрашенных антителом против GITRL (закрашенная гистограмма), с флуоресценцией данных клеток, окрашенных антителом контроля изотипа (незакрашенная гистограмма). Фиг.7F. Нестимулированные клетки лимфатического узла окрашивали антителами против CD4, против CD8, против CD25 и/или против GITRL. $CD4^+CD8^-$ клетки (верхний левый квадрант), а не $CD4^-CD8^+$ клетки (нижний правый квадрант) далее разделяли в отношении экспрессии данными клетками CD25. Экспрессию GITRL сортированными $CD4^+CD8^-CD25^-$ (верхняя правая панель гистограмм), $CD4^+CD8^-CD25^+$ (нижняя правая панель гистограмм) или

CD4⁻CD8⁺ (нижняя (средняя) панель гистограмм) клетками лимфатического узла определяли сравнением интенсивности флуоресценции данных клеток, окрашенных антителом против GITRL (закрашенные гистограммы), с флуоресценцией данных клеток, окрашенных антителом контроля изотипа (незакрашенные гистограммы).
 5 Результаты представляют пять независимых экспериментов.

На фиг.8 показана отрицательная регуляция APC GITRL после стимуляции. Фиг.8А.

Экспрессию GITRL очищенными В-клетками селезенки B220⁺ или общими перитонеальными (PerC) B220⁺CD11b⁺ В-1 В-клетками определяли для различных
 10 моментов времени после обработки polyI:C (10 мкг/мл), LPS (0,5 мкг/мл), CpG (ODN 1826, 1 мкМ), анти-CD40 и IL-4 (10 мкг/мл и 20 нг/мл соответственно) и анти-IgM (F(ab')₂-фрагмент антител козы против IgM, μ -цепь, 1 мкг/мл). Представлена интенсивность флуоресценции окрашенных анти-GITRL стимулированных клеток (закрашенные
 15 гистограммы), окрашенных анти-GITRL нестимулированных (среда) клеток (незакрашенные гистограммы со сплошной линией) и клеток, окрашенных антителом контроля изотипа (незакрашенные гистограммы с пунктирной линией). Фиг.8В.

Экспрессию GITRL B220⁺ В-клетками (закрашенная гистограмма), представленными среди всех спленоцитов, обработанных mAb против CD3 (0,5 мкг/мл) после периода
 20 культивирования длительностью 48 часов, сравнивали с экспрессией GITRL нестимулированными B220⁺ В-клетками (незакрашенные гистограммы со сплошной линией) и B220⁺ В-клетками, окрашенными антителом контроля изотипа (незакрашенная гистограмма с пунктирной линией). Фиг.8С. Экспрессия GITRL
 25 (верхние панели гистограмм) и B7.2 (т.е. CD86) (нижние панели гистограмм) очищенными CD11c⁺ DC после культивирования с LPS (0,5 мкг/мл) и без него в указанные моменты времени. Фиг.8D. Экспрессия GITRL общими спленоцитами, разделенными на экспрессирующие CD4⁺ или CD8⁺ клетки после периода
 30 культивирования длительностью 48 часов в отсутствие или в присутствии растворимого mAb против CD3 (0,5 мкг/мл). Графики представляют от двух до четырех независимых экспериментов; все эксперименты проводили на тканях, выделенных из мышей BALB/c.

На фиг.9 продемонстрировано влияние блокирования взаимодействия GITR/GITRL
 35 на ингибирование пролиферации лимфоцитов. На фиг.9А и 9В отрезки указывают на значения стандартного отклонения. Фиг.9А. Пролиферацию клеток (ось у) лимфатического узла (LN; 1×10^5) и селезенки (Sp; $0,5 \times 10^5$) с клетками CD25⁺ или без них (все или $\Delta 25$ соответственно) определяли после 72 часов культивирования с
 40 различными концентрациями растворимого антитела против CD3 (ось х). Клетки инкубировали в присутствии очищенного mAb против GITRL (10 мкг/мл; закрашенные кружки) или крысиным антителом контроля изотипа IgG2a (10 мкг/мл; незакрашенные кружки). Результаты представлены тремя независимыми экспериментами. Фиг.9В. CD4⁺CD25⁻ или CD8⁺ Т-клетки культивировали в присутствии 5×10^4 облученных (3000 R)
 45 истощенных по Т-клеткам APC и в присутствии 5×10^4 облученных (8000 R) YB2/0-GITRL (незакрашенные кружки) или контрольных YB2/0 (закрашенные кружки) клеток. Культуры активировали различными концентрациями растворимого mAb против CD3 (ось х) и измеряли пролиферацию (ось у) после 72-часового периода
 50 культивирования. Фиг.9С. Среднюю флуоресценцию (ось х) очищенных CD4⁺CD25⁻ Т-клеток, окрашенных антителом против GITR, определяли в различные периоды времени после активации растворимым антителом против CD3 (0,5 мкг/мл) в

присутствии облученных (3000R) истощенных по Т-клеткам спленоцитов. Результаты представляют, по меньшей мере, два независимых эксперимента.

На фиг.10 продемонстрировано, что экспрессия GITR CD25⁻ Т-клетками требуется для отмены супрессии. Фиг.10А. Пролиферацию совместных культур CD4⁺CD25⁻ Т-клеток (5×10^4) из различных нокаут-мышей и различные количества CD4⁺CD25⁺ Т-клеток (ось x) из различных нокаут-мышей [(Aa) CD4⁺CD25⁻:*GITR*^{+/+}, CD4⁺CD25⁺:*GITR*^{+/+}; (Ab) CD4⁺CD25⁻:*GITR*^{+/+}, CD4⁺CD25⁺:*GITR*^{-/-}; (Ac) CD4⁺CD25⁻:*GITR*^{-/-}, CD4⁺CD25⁺:*GITR*^{+/+} и (Ad) CD4⁺CD25⁻:*GITR*^{-/-}, CD4⁺CD25⁺:*GITR*^{-/-}], инкубированные с облученными APC из мышей дикого типа (5×10^4) и с растворимым анти-CD3 (0,5 мкг/мл) и с 2 мкг/мл антитела против GITR (закрашенные кружки) или с антителом контроля изотипа (незакрашенные кружки), определяли путем измерения захвата ³H-тимидина (счет/мин; ось y). Фиг.10В. Пролиферацию совместных культур проводили, как указано выше (фиг.10А), с различными количествами мышинных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток (ось x) и или (Ba) мышинными CD4⁺CD25⁻ Т-клетками, или (Bb) крысиными CD4⁺CD25⁻ Т-клетками в присутствии облученных (3000 R) крысиных APC. Культуры стимулировали коктейлем антител против крысиного и мышинного анти-CD3 (0,25 мкг/мл каждого) и обрабатывали 2 мкг/мл контроля изотипа (крысиные IgG; незакрашенные кружки) или антителом против GITR (DTA-1; закрашенные кружки). Отрезки указывают на значения стандартного отклонения, рассчитанные из значений пролиферации в трех параллельных культурах. Фиг.10С. Показана флуоресценция (ось x) окрашенных CFSE мышинных CD4⁺CD25⁺ (верхние панели) и крысиных CD4⁺CD25⁻ Т-клеток (нижние панели), совместно культивированных в соотношении супрессор-отвечающая клетка 1:8 с контролем изотипа (крысиный IgG; левые панели) или антителом против GITR (DTA-1; правые панели). Мышиные и крысиные субпопуляции Т-клеток различались путем окрашивания специфичными антителами против CD4. Представлены результаты двух-четырёх независимых экспериментов.

На фиг.11 продемонстрировано, что сигналы GITR требуются для преодоления супрессии, опосредованной эндогенными регуляторными Т-клетками. Фиг.11А. Меченные CFSE клетки лимфатического узла (LN) (5×10^4) из мышей B6 (дикий тип), *GITR*^{+/+}, *CD28*^{-/-} и *GITR*^{-/-} культивировали в течение 72 часов с различными концентрациями растворимого mAb против CD3 (ось x). Все клетки LN культивировали без экзогенного IL-2 (50 ед/мл) (Aa) и с ним (Ac). Клетки LN, истощенные по CD25⁺ клеткам (LNΔ25), культивировали без экзогенного IL-2 (50 ед/мл) (Ab) и с ним (Ad). Отрезки, указывающие значения стандартного отклонения, пропущены для ясности. Фиг.11В. Оценку путем проточной цитометрии разведения CFSE сортированными по CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками лимфоузла, выделенными из животных *CD28*^{-/-}, *GITR*^{-/-}, *GITR*^{+/+} или *GITR*^{+/+}, проводили после культивирования в течение 72 часов. Данные результаты соответствовали концентрации растворимого анти-CD3, равной 0,62 мкг/мл (как на фиг.11А). Фиг.11С. Анализ путем проточной цитометрии экспрессии CD25 проводили на H-2D^b-позитивных CD4⁺CD25⁻ клетках, которые оставались нестимулированными (незакрашенные гистограммы с пунктирной линией), были получены из мышей *GITR*^{-/-} (незакрашенные гистограммы со сплошной линией) или были получены из мышей *GITR*^{+/+} (закрашенные гистограммы). Экспрессию CD25 клетками CD4⁺CD25⁻,

полученными из мышей *GITR*^{-/-} или *GITR*^{+/+}, определяли через 24 часа культивирования с APC LN из мышей дикого типа, в присутствии анти-CD3 (0,5 мкг/мл) и в отсутствие (левые панели гистограмм) или присутствии (правые панели гистограмм) CD4⁺CD25⁺ клеток из мышей BALB/c в соотношении супрессор:отвечающая клетка 1:2. Также определяли экспрессию CD25 в отсутствие (верхние панели гистограмм) или в присутствии (нижние панели гистограмм) 50 ед/мл rhIL-2. Приведенные выше результаты представляют три независимых эксперимента.

На фиг.12 продемонстрировано, что CD28-зависимая совместная стимуляция усиливает экспрессию и реактивность *GITR*. Фиг.12А. Анализ путем проточной цитометрии экспрессии *GITR* очищенными CD4⁺CD25⁻ или CD8⁺ Т-клетками (2,5×10⁴) через 72 часа культивирования со связанным на планшете анти-CD3 и 2 мкг/мл связанного на планшете контролем изотипа хомяка («аCD3») или связанного на планшете анти-CD28 («аCD3+аCD28»). Фиг.12В (левая панель гистограмм).

Окрашивание против *GITR* CD4⁺CD25⁻ Т-клеток, культивируемых в присутствии облученных, истощенных по Т-клеткам спленоцитов и растворимого анти-CD3 (0,5 мкг/мл) в присутствии коктейля антител против CD80/86 (10 мкг/мл каждого) (т.е. антител против B7.1/7.2) или в его отсутствие в течение 72 часов. Фиг.12В (правая панель гистограмм). Окрашивание против *GITR* CD4⁺CD25⁻ Т-клеток, культивируемых в присутствии облученных, истощенных по Т-клеткам спленоцитов и растворимого анти-CD3 (0,5 мкг/мл) в присутствии коктейля антител против IL-2 и IL-2Ra. Фиг.12С. Пролиферацию оценивали в присутствии или отсутствии mAb против CD80/86 (10 мкг/мл каждого; «аB7») с добавлением mAb против *GITR* (24 мкг/мл; «DTA-1») или антитела контроля изотипа (2 мкг/мл; «крысиный IgG»). Отрезки указывают на значения стандартного отклонения. Результаты представляют два или три независимых эксперимента.

На фиг.13 продемонстрировано, что связывание *GITRL* с *GITR* предоставляет костимуляторный сигнал в отношении эффекторных Т-клеток. Фиг.13А.

Пролиферацию эффекторных Т-клеток *GITR*⁺/TCR⁺ HT-2 (4×10⁴) отдельно (белые столбцы) или в совместной культуре с 1×10⁴ контрольных клеток YB2/0 (штрихованные столбцы) или экспрессирующих *GITRL* клеток YB2/0 (закрашенные столбцы), в отсутствие или в присутствии одной или двух гранул анти-CD3 на клетку HT-2, определяли измерением захвата ³Н-тимидина (счет/мин; ось у). Фиг.13В.

Пролиферацию 4×10⁴ клеток HT-2, совместно культивируемых с двумя гранулами анти-CD3 на клетку, 1×10⁴ экспрессирующих *GITRL* клеток YB2/0, и возрастающими концентрациями (нг/мл; ось х) антитела против *GITRL* (5F1.1; закрашенные кружки) или антитела контроля изотипа (rIgG1; незакрашенные кружки) определяли измерением захвата ³Н-тимидина (счет/мин; ось у). Фиг.13С. Пролиферацию 4×10⁴

клеток HT-2, совместно культивируемых с двумя гранулами анти-CD3 на клетку, 1×10⁴ экспрессирующих *GITRL* клеток YB2/0, и возрастающими концентрациями (нг/мл; ось х) четырех различных антител против *GITRL*: 5F1.1 (закрашенные кружки), MGLT-10 (закрашенные квадраты), MGTL-15 (незакрашенные кружки) или поликлонального антитела (незакрашенные кружки) определяли измерением захвата ³Н-тимидина (счет/мин; ось у).

На фиг.14 продемонстрировано, что блокирование связывания *GITR*-*GITRL* антителом против *GITRL* предотвращает адаптивный перенос индуцированного PLP

экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ). Оценивали частоту возникновения ЕАЕ у мышей. Мышам вводили инъекцией 5×10^6 спленоцитов, которые выделяли у самок мышей SLJ, иммунизированных 150 мкг пептида PLP, и повторно стимулировали *ex vivo* в течение 3 суток в трех различных вариантах условий: 10 мкг/мл одного PLP (незакрашенные кружки), 10 мкг/мл PLP и 10 мкг/мл антитела контроля изотипа (СКО1; закрашенные кружки) или 10 мкг/мл PLP и антитела против GITRL (5F1.1; закрашенные квадраты). Мониторинг возникновения ЕАЕ проводили в течение 52 суток (ось x) и считали по шкале от 0 до 5 (ось y).

Подробное описание изобретения

Поскольку антитела против GITR, продуцирующие противодействие подавляющей активности, как оказывается, продуцируют агонистический сигнал, было предсказано, что взаимодействие GITR с GITRL должно также ингибировать подавляющую активность регуляторных Т-клеток. Недостаток подходящих реагентов ранее препятствовал подробному функциональному анализу взаимодействий GITR/GITRL в более физиологических условиях. Идентифицировали мышинный ортолог GITRL и получали антагонистические антитела, которые специфично связываются с мышинным ортологом GITRL, т.е. не характеризуются перекрестным взаимодействием с человеческим GITRL.

С использованием данного реагента оценивали распределение в тканях и регуляцию GITRL. Кроме того, исследовали способность взаимодействий GITR/GITRL регулировать супрессию Т-клеток с использованием мышей *GITR*^{-/-}. Поскольку и CD25⁻, и CD25⁺ Т-клетки экспрессируют GITR, хотя в различной степени, предыдущие исследования, демонстрирующие ингибирование супрессорной функции после обработки совместных культур агонистическим антителом против GITR, приводили к двусмысленным результатам в отношении клеточной мишени воздействия GITR. С использованием комбинации CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ Т-клеток из мышей дикого типа и *GITR*^{-/-} в экспериментах с совместным культивированием было обнаружено, что связывание GITR на отвечающих CD4⁺CD25⁻ Т-клетках, а не на CD4⁺CD25⁺ супрессорных Т-клетках, требовалось для отмены супрессии. В отсутствие CD4⁺CD25⁺ Т-клеток Т-клетки *GITR*^{-/-} характеризовались пролиферативными реакциями, сходными с таковыми у животных дикого типа, хотя они полностью супрессируются в присутствии физиологических количеств CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. Данные результаты впервые указывают на то, что взаимодействие GITR/GITRL предоставляет ранее не известный сигнал, который делает эффекторные Т-клетки устойчивыми к ингибиторному действию CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. Таким образом, отрицательная регуляция экспрессии GITRL после вторичных воспалительных сигналов может способствовать опосредованной CD4⁺CD25⁺ супрессии и предотвращать вредные последствия избыточного ответа эффекторных клеток.

Данное исследование пролило свет на механизмы, лежащие в основе взаимодействия GITR и его лиганда GITRL, особенно касательно действия на CD4⁺CD25⁻ Т-клетки, которые в традиционном понимании являются мишенью супрессорной активности. В итоге с использованием мышей *GITR*^{-/-} было продемонстрировано, что способность mAb против GITR (агонистического мышинного антитела против GITR) отменять супрессию опосредована его действием на CD4⁺CD25⁻, а не на CD4⁺CD25⁺ Т-клетки (как ранее предполагалось в некоторых исследованиях). APC (антигенпредставляющие клетки) конститутивно

экспрессируют GITRL, который отрицательно регулируется после передачи сигнала с Toll-подобного рецептора. Хотя $CD4^+CD25^-$ Т-клетки мышей *GITR*^{-/-} были способны развивать пролиферативные реакции, они были неспособны к пролиферации в присутствии физиологических количеств $CD4^+CD25^+$ Т-клеток. Таким образом, GITRL предоставляет значимый сигнал для $CD4^+CD25^-$ Т-клеток и других эффекторных Т-клеток (например, $CD8^+$ Т-клеток), делая их устойчивыми к опосредованной $CD4^+CD25^+$ регуляции при инициации иммунного ответа. Отрицательная регуляция GITRL воспалительными стимулами может увеличивать чувствительность эффекторных Т-клеток (например, $CD4^+CD25^-$ Т-клеток) к супрессорной активности, например, в ходе злокачественного или инфекционного заболевания.

И в завершение, настоящее изобретение относится к нуклеотидной и аминокислотной последовательностям нового мышинового гомолога человеческого GITRL. Человеческий GITRL идентифицирован (Kwon et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:6056-61; Gurney et al. (1999) Curr. Biol. 9:215-18); кроме того, совсем недавно несколько исследовательских групп также сообщили о клонировании мышинового лиганда GITR (Kim et al., 2003; Tone et al., 2003; Yu et al., 2003).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к нуклеотидным последовательностям, аминокислотным последовательностям и их активным фрагментам, и/или слитым белкам, относящимся к новому мышинному гомологу человеческого GITRL. Полинуклеотиды GITRL по изобретению включают в себя полинуклеотиды, которые модулируют экспрессию GITRL, например экспрессирующие векторы, содержащие полинуклеотиды GITRL, которые могут положительно регулировать экспрессию GITRL, и/или антисмысловые и/или относящиеся к РНКi полинуклеотиды GITRL, которые отрицательно регулируют экспрессию GITRL. Также предоставляется применение таких полинуклеотидов для модулирования экспрессии GITRL в клетках и/или животных. В дополнение к полипептидам GITRL, изобретение также относится к другим агонистическим полипептидам, например к активным фрагментам GITRL и/или слитым белкам GITRL, которые способны имитировать GITRL, т.е. индуцировать активность GITR в эффекторных Т-клетках. Трансформированные клетки-хозяева и трансгенные животные, содержащие полинуклеотиды GITRL, также входят в объем изобретения.

В другом аспекте предоставляются антитела, которые специфично связываются с новыми мышинными полипептидами GITRL по изобретению (т.е. которые не связываются с человеческим GITRL). В частности, предоставляются нейтрализующие антитела, которые ингибируют активность GITRL (например, антитела, которые препятствуют связыванию GITRL с GITR); о данных антителах можно сказать, что они нейтрализуют активность GITRL (т.е. делают GITRL неэффективным).

Нейтрализующие антитела по изобретению включают в себя не относящиеся к человеку и человеческие антитела к GITRL, которые ингибируют активность GITRL, а также химеризованные и/или гуманизированные версии не относящихся к человеку антител по изобретению, которые ингибируют активность GITRL. Также в объем изобретения включены антагонистические антитела, которые могут содержать одну или несколько мутаций, способных функционировать в плане увеличения времени полужизни, стабильности и аффинности антитела или способных функционировать в плане модулирования эффекторных функций антитела.

Другой аспект изобретения относится к анализам по скринингу, в которых полинуклеотиды и полипептиды GITRL, включающие, но без ограничения, их

человеческие гомологи, применяют для идентификации соединений, способных модулировать активность GITR в клетке, организме или у субъекта. Изобретение также относится к способам оценки эффективности идентифицированных соединений, причем число Т-клеток пациента определяется до и после введения

идентифицированного соединения. Кроме того, изобретение относится к способам лечения пациентов или субъектов с использованием идентифицированных соединений.

В дополнение к предоставлению способов скрининга тестируемых соединений, способных модулировать активность GITR, например агонистов GITR или антагонистов GITR, изобретение относится к способам диагностики, прогноза и мониторинга прогресса нарушений, относящихся к нарушенной регуляции иммунной системы, например аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, и злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний.

В данном описании также описаны способы применения GITRL и родственных молекул по изобретению, включая молекулы-агонисты GITR (т.е. полинуклеотиды GITRL, полипептиды GITRL, их активные фрагменты и/или слитые белки, низкомолекулярные агонисты и агонистические в отношении GITR антитела) и молекулы-антагонисты GITR (т.е. ингибиторные полинуклеотиды GITRL, нейтрализующие GITR антитела, нейтрализующие GITRL антитела, низкомолекулярные антагонисты и слитые белки GITR), для терапевтического лечения нарушений, связанных с нарушенной регуляцией иммунной системы. Например, предоставляются способы лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, отторжения трансплантата и/или других воспалительных заболеваний, включающих введение субъекту антагонистов GITR, например нейтрализующего антитела против GITR; также предоставляются способы лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе злокачественной опухоли или инфекционных заболеваний, включающие введение субъекту агонистов GITR, например GITRL, или его агонистического слитого белка. Альтернативно, предоставляются способы индукции или ингибирования пролиферации Т-клеток посредством введения агонистов GITR, например GITRL (включая его агонистические слитые белки), или антагонистов GITR, например нейтрализующих антител против GITRL или антагонистических слитых белков GITR соответственно. Сходным образом, также предоставлены способы блокирования или усиления супрессии Т-клеток в присутствии $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, включающие введения агонистов GITR, например GITRL (включая их агонистические слитые белки), или антагонистов GITR, например нейтрализующих антител против GITRL соответственно. Популяции Т-клеток, обработанных полипептидами GITRL и родственными молекулами (включая их агонистические слитые белки), входят в объем изобретения и могут вводиться субъекту способом лечения злокачественной опухоли или инфекционного заболевания. Предоставлены другие способы лечения, включая способ лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или отторжения трансплантата, антагонистическим соединением, которое снижает активность GITR, и способы лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе злокачественной опухоли или инфекционного заболевания агонистическим соединением, которое повышает активность GITR. Фармацевтические композиции, например вакцинные адъюванты, содержащие полинуклеотиды, полипептиды GITRL и родственные молекулы (включая агонистические слитые белки GITRL и антагонистические антитела против GITRL) по

изобретению также входят в объем изобретения. Способы по настоящему изобретению направлены на GITRL и GITR, включая, но без ограничения, мышинные GITRL и GITR и их гомологи; в состав данных гомологов специально включены человеческие GITRL и GITR.

Полинуклеотиды и полипептиды GITRL

Настоящее изобретение относится к новым выделенным и очищенным полинуклеотидам и полипептидам, относящимся к новому лиганду GITR (GITRL). Гены, полинуклеотиды, белки и полипептиды по настоящему изобретению включают, но без ограничения, мышинный GITRL и его гомологи.

Например, изобретение относится к очищенным и выделенным полинуклеотидам, кодирующим мышинный GITRL. Предпочтительные последовательности ДНК по изобретению включают в себя геномные, кДНК и химически синтезированные последовательности ДНК.

Нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующая данный новый лиганд, обозначенная как кДНК мышинного GITRL, приведена в SEQ ID NO:1. Полинуклеотиды по настоящему изобретению также включают в себя полинуклеотиды, которые гибридизуются в жестких условиях с SEQ ID NO:1 или с комплементарной ей последовательностью, и/или кодируют полипептиды, которые сохраняют существенную биологическую активность (т.е. активные фрагменты) полноразмерного мышинного GITRL. Полинуклеотиды по настоящему изобретению также включают в себя непрерывные части последовательности, приведенной в SEQ ID NO:1, содержащие, по меньшей мере, 21 следующих друг за другом нуклеотидов.

Нуклеотидная последовательность геномной ДНК, кодирующей данный новый лиганд, обозначенная как геномная ДНК мышинного GITRL, приведена в SEQ ID NO:3. Полинуклеотиды по настоящему изобретению также включают в себя полинуклеотиды, которые гибридизуются в жестких условиях с SEQ ID NO:3 или с комплементарной ей последовательностью, и/или кодируют полипептиды, сохраняющие существенную биологическую активность полноразмерного мышинного GITRL. Полинуклеотиды по настоящему изобретению также включают в себя непрерывные части последовательности, приведенные SEQ ID NO:3, содержащие, по меньшей мере, 21 следующих друг за другом нуклеотидов.

Аминокислотная последовательность мышинного GITRL приведена в SEQ ID NO:2. Полипептиды по настоящему изобретению также включают в себя непрерывные части последовательности, приведенной в SEQ ID NO:2, содержащие, по меньшей мере, 7 следующих друг за другом аминокислот. Предпочтительный полипептид по настоящему изобретению включает в себя любую непрерывную часть последовательности, приведенной в SEQ ID NO:2, которая сохраняет существенную биологическую активность полноразмерного мышинного GITRL. Полинуклеотиды по настоящему изобретению также включают в себя, в дополнение к полинуклеотидам мышинного происхождения, описанным выше, полинуклеотиды, которые кодируют аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2, или ее непрерывную часть и которые отличаются от описанных выше полинуклеотидов только вследствие хорошо известной вырожденности генетического кода.

Выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению могут использоваться в качестве зондов для гибридизации и праймеров с целью идентификации и выделения нуклеиновых кислот, имеющих последовательности, идентичные в отношении тех, которые кодируют описанные полинуклеотиды, или сходные с ними. Способы гибридизации для идентификации и выделения нуклеиновых кислот включают

полимеразную цепную реакцию (ПЦР), способы саузерн-гибридизации, гибридизацию *in situ* и нозерн-гибридизацию и хорошо известны специалистам в данной области.

Реакции гибридизации могут проводиться в условиях различной жесткости.

Жесткость реакции гибридизации заключается в затрудненности, с которой любые две молекулы нуклеиновой кислоты будут гибридизоваться друг с другом.

Предпочтительно каждый гибридизующийся полинуклеотид гидридуется с соответствующим ему полинуклеотидом в условиях сниженной жесткости, более

предпочтительно в жестких условиях и наиболее предпочтительно в условиях высокой жесткости. Примеры условий жесткости показаны ниже в таблице 1: условия высокой жесткости соответствуют тем, которые, по меньшей мере, столь же жесткие, как, например, условия A-F; жесткие условия, по меньшей мере, такие же, как, например, условия G-L; условия сниженной жесткости, по меньшей мере, столь же жесткие, как, например, условия M-R.

Таблица 1				
Условия жесткости	Полинуклеотидный гибрид	Длина гибрида (н.п.) ¹	Температура и буфер гибридизации ²	Температура и буфер промывки ³
A	ДНК:ДНК	>50	65°C; 1X SSC или 42°C; 1X SSC, 50% формамид	65°C; 0,3X SSC
B	ДНК:ДНК	<50	T _B *; 1X SSC	T _B *; 1X SSC
C	ДНК:РНК	>50	67°C; 1X SSC или 45°C; 1X SSC, 50% формамид	67°C; 0,3X SSC
D	ДНК:РНК	<50	T _D *; 1X SSC	T _D *; 1X SSC
E	РНК:РНК	>50	70°C; 1X SSC или 50°C; 1X SSC, 50% формамид	70°C; 0,3X SSC
F	РНК:РНК	<50	T _F *; 1X SSC	T _F *; 1X SSC
G	ДНК:ДНК	>50	65°C; 4X SSC или 42°C; 4X SSC, 50% формамид	65°C; 1X SSC
H	ДНК:ДНК	<50	T _H *; 4X SSC	T _H *; 4X SSC
I	ДНК:РНК	>50	67°C; 4X SSC или 45°C; 4X SSC, 50% формамид	67°C; 1X SSC
J	ДНК:РНК	<50	T _J *; 4X SSC	T _J *; 4X SSC
K	РНК:РНК	>50	70°C; 4X SSC или 50°C; 4X SSC, 50% формамид	67°C; 1X SSC
L	РНК:РНК	<50	T _L *; 2X SSC	T _L *; 2X SSC
M	ДНК:ДНК	>50	50°C; 4X SSC или 40°C; 6X SSC, 50% формамид	50°C; 2X SSC
N	ДНК:ДНК	<50	T _N *; 6X SSC	T _N *; 6X SSC
O	ДНК:РНК	>50	55°C; 4X SSC или 42°C; 6X SSC, 50% формамид	55°C; 2X SSC
P	ДНК:РНК	<50	T _P *; 6X SSC	T _P *; 6X SSC
Q	РНК:РНК	>50	60°C; 4X SSC или 45°C; 6X SSC, 50% формамид	60°C; 2X SSC
R	РНК:РНК	<50	T _R *; 4X SSC	T _R *; 4X SSC

¹ Длина гибрида соответствует предсказанной для гибризованной(ым) области(ям) гибридизующихся полинуклеотидов. При гибридизации полинуклеотида с полинуклеотидом-мишенью с неизвестной последовательностью длина гибрида принимается как длина гибридизующегося полинуклеотида. При гибридизации полинуклеотидов с известной последовательностью длина гибрида может определяться выравниванием последовательностей данных полинуклеотидов и идентификацией области или областей оптимальной комплементарности последовательности.

² SSPE (1xSSPE представляет собой 0,15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄ и 1,25mM EDTA, pH 7,4) в буферах гибридизации и промывки может заменяться на SSC (1xSSC представляет собой 0,15M NaCl и 15mM цитрат натрия); промывки проводят в течение 15 минут после завершения гибридизации.

$T_m^* - T_R^*$: Температура гибридизации для гибридов, которые, как предсказано, составляют менее 50 пар оснований в длину, должна быть на 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) гибрида, где T_m определяется по следующим уравнениям. Для гибридов менее 18 пар оснований в длину T_m (°C) = 2 (число оснований A+T) + 4 (число оснований G+C). Для гибридов от 18 до 49 пар оснований в длину T_m (°C) = 81,5 + 16,6(log₁₀ Na⁺) + 0,41(% G+C) - (600/N), где N составляет число оснований в гибриде и Na⁺ представляет собой концентрацию ионов натрия в буфере гибридизации (Na⁺ для 1X SSC = 0,165M).

Дополнительные примеры условий жесткости для гибридизации полинуклеотидов предоставлены в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Chs. 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), и Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Sects. 2.10 & 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995), включенных в данное описание в качестве ссылки.

Выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению могут использоваться в качестве зондов и праймеров для гибридизации с целью идентификации и выделения ДНК, имеющей последовательности, кодирующие аллельные варианты описанных полинуклеотидов. Аллельные варианты представляют собой встречающиеся в природе альтернативные формы описанных полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды, идентичные или имеющие значительное сходство с полипептидами, кодируемыми описанными полинуклеотидами. Предпочтительно аллельные варианты имеют, по меньшей мере, 90% идентичности по последовательности (более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности; наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности) с описанными полинуклеотидами.

Выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению могут также использоваться в качестве зондов и праймеров для гибридизации с целью идентификации и выделения молекул ДНК, имеющих последовательности, кодирующие полипептиды, гомологичные описанным полинуклеотидам. Данные гомологи представляют собой полинуклеотиды и полипептиды из видов, отличных от тех, к которым относятся описанные полипептиды и полинуклеотиды, или молекулы из одного вида, но со значительным сходством по последовательности относительно описанных полинуклеотидов и полипептидов. Предпочтительно гомологи полинуклеотидов имеют, по меньшей мере, 50% идентичности по последовательности (более предпочтительно, по меньшей мере, 75% идентичности; наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности) с описанными полинуклеотидами, тогда как гомологи полипептидов имеют, по меньшей мере, 30% идентичности по последовательности (более предпочтительно, по меньшей мере, 45% идентичности; наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 60% идентичности) с описанными полипептидами. Предпочтительно гомологи описанных полинуклеотидов и полипептидов выделены из видов млекопитающих.

Выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению могут также использоваться в качестве зондов и праймеров для гибридизации с целью идентификации клеток и тканей, которые экспрессируют полипептиды по настоящему изобретению, и условия, в которых они экспрессируются.

Кроме того, выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению могут использоваться для изменения (т.е. усиления, снижения или модификации) экспрессии генов, соответствующих полинуклеотидам по настоящему изобретению, в клетке или организме. Данные соответствующие гены представляют собой геномные последовательности ДНК по настоящему изобретению (например, SEQ ID NO:3),

которые транскрибируются с продукцией их РНК, из которых полинуклеотиды кДНК по настоящему изобретению (например, SEQ ID NO:1).

Измененная экспрессия генов по настоящему изобретению, включая, но без ограничения, мышинный GITRL и его гомологи, могут достигаться в клетке или организме путем использования различных ингибиторных полинуклеотидов, например антисмысловых полинуклеотидов (например, антисмысловых молекул нуклеиновой кислоты GITRL) и рибозимов, которые связываются и/или расщепляют мРНК, транскрибированные с генов по изобретению (см., например, Galderisi et al. (1999) *J. Cell Physiol.* 181:251-57; Sioud (2001) *Curr. Mol. Med.* 1:575-88). Такие ингибиторные полинуклеотиды могут использоваться при профилактике или лечении аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний, отторжения трансплантата и сходных или связанных заболеваний.

Антисмысловые полинуклеотиды или рибозимы по изобретению могут быть комплементарными всей кодирующей цепи гена по изобретению или только его части. Альтернативно, антисмысловые полинуклеотиды или рибозимы могут быть комплементарными некодирующей области кодирующей цепи гена по изобретению. Антисмысловые полинуклеотиды или рибозимы могут конструироваться с использованием химического синтеза и реакций ферментативного лигирования с использованием методик, хорошо известных в данной области. Нуклеозидные связи химически синтезированных полинуклеотидов могут модифицироваться для усиления их способности противодействовать опосредованной нуклеазами деградации, а также для усиления их специфичности в отношении последовательности. Такие модификации связей включают, но без ограничения, связи фосфотиоата, метилфосфоната, фосфороамидата, боранофосфата, морфолина и пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК) (Galderisi et al., supra; Heasman (2002) *Dev. Biol.* 243:209-14; Micklefield (2001) *Curs. Med. Chem.* 8:1157-79). Альтернативно, данные молекулы могут продуцироваться биологически с использованием экспрессирующего вектора, в который субклонирован полинуклеотид по настоящему изобретению в антисмысловой (т.е. обратной) ориентации.

Ингибиторные полинуклеотиды по настоящему изобретению также включают в себя образующие триплекс олигонуклеотиды (TFO), которые связываются с большой бороздкой дуплекса ДНК с высокой специфичностью и активностью (Knauert and Glazer (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10:2243-51). Экспрессия генов по настоящему изобретению может ингибироваться направленным действием TFO, комплементарных регуляторным областям генов (т.е. промоторным и/или энхансерным последовательностям) с образованием структур тройной спирали, которые предотвращают транскрипцию данных генов.

В одном из вариантов осуществления изобретения ингибиторные полинуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой молекулы коротких интерферирующих РНК (siРНК) (например, нуклеиновые молекулы siРНК GITRL). Данные молекулы siРНК являются короткими (предпочтительно 19-25 нуклеотидов; наиболее предпочтительно 19 или 21 нуклеотидов), двухцепочечными молекулами РНК, которые вызывают специфическую в плане последовательности деградацию мРНК-мишени. Данная деградация известна как РНК-интерференция (РНКi) (например, Bass (2001) *Nature* 411:428-29). Впервые выявленная в низших организмах, РНКi эффективно применяется на клетках млекопитающих и, как было недавно показано, предотвращает фульминантный гепатит у мышей, обработанных молекулами siРНК, направленными на мРНК Fas (Song et al. (2003) *Nature Med.* 9:347-

51). Кроме того, недавно было сообщено о том, что интратекально доставленная siРНК блокирует болевые ответы на двух моделях (агонист-индуцированная болевая модель и нейропатическая болевая модель) у крыс (Dorn et al. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(5):e49).

Молекулы siРНК по настоящему изобретению могут генерироваться путем отжига вместе двух комплементарных одноцепочечных молекул РНК (одна из которых совпадает с частью мРНК-мишени) (Fire et al., патент США № 6506559) или путем применения единственной молекулы РНК-шпильки, которая сворачивается сама на себя с продукцией необходимой двухцепочечной части (Yu et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6047-52). Молекулы siРНК могут химически синтезироваться (Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-98) или продуцироваться посредством транскрипции *in vitro* с использованием одноцепочечных ДНК-матриц (Yu et al., *supra*). Альтернативно, молекулы siРНК могут продуцироваться биологически, кратковременно (Yu et al., *выше*; Sui et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-20) или стабильно (Paddison et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1443-48), с использованием экспрессирующего(их) вектора(ов), содержащего смысловые и антисмысловые последовательности siРНК. Недавно снижение уровня мРНК-мишени в первичных человеческих клетках эффективным и специфичным в отношении последовательности образом было продемонстрировано с использованием аденовирусных векторов, экспрессирующих РНК-шпильки, которые далее процессируются в siРНК (Arts et al. (2003) *Genome Res.* 13:2325-32).

Молекулы siРНК, направленные на полинуклеотиды по настоящему изобретению, могут обозначаться на основе критериев, хорошо известных в данной области (например, Elbashir et al. (2001) *EMBO J.* 20:6877-88). Например, сегмент-мишень мРНК-мишени предпочтительно должен начинаться с АА (наиболее предпочтительно), ТА, ГА или СА; отношение GC молекулы siРНК предпочтительно должно составлять 45-55%; молекула siРНК предпочтительно не должна содержать три одинаковых нуклеотида в ряд; молекула siРНК предпочтительно не должна содержать семь смешанных G/C в ряд; и сегмент-мишень предпочтительно должен находиться в области ORF мРНК-мишени и предпочтительно должен отстоять, по меньшей мере, на 75 н.п. после иницирующего ATG и, по меньшей мере, на 75 н.п. перед стоп-кодоном. На основе данных критериев или на основе других известных критериев (например, Reynolds et al. (2004) *Nature Biotechnol.* 22:326-30) молекулы siРНК по настоящему изобретению, направленные на них полинуклеотиды РНК по настоящему изобретению, могут конструироваться рядовыми специалистами в данной области.

Измененная экспрессия генов по настоящему изобретения в организме может также достигаться посредством создания не относящихся к человеку трансгенных животных, в геномы которых введены полинуклеотиды по настоящему изобретению. Такие трансгенные животные включают животных, которые имеют множественные копии гена (т.е. трансгена) по настоящему изобретению. Тканеспецифическая(ие) регуляторная(ые) последовательность(и) может(гут) быть функционально связанной(ыми) с трансгенами для прямой экспрессии полипептида по настоящему изобретению в конкретных клетках или на конкретной стадии развития. Способы получения трансгенных животных посредством манипуляции с эмбрионами и микроинъекции, особенно таких животных, как мышь, стали общепринятыми и хорошо известны в данной области (например, Bockamp et al., *Physiol. Genomics*, 11:115-32 (2002)).

Измененная экспрессия генов по настоящему изобретению в организме также может достигаться посредством создания животных, эндогенные гены которых, соответствующие полинуклеотидам по настоящему изобретению, разрушены посредством встраивания посторонних нуклеотидных последовательностей (т.е. ⁵ нокаут-животного). Кодированная область данного эндогенного гена может быть разрушена с образованием за счет этого нефункционального белка. Альтернативно, вышележащая регуляторная область эндогенного гена может разрушаться или заменяться различными регуляторными элементами, что приводит к измененной ¹⁰ экспрессии еще функционального белка. Способы получения нокаут-животных включают гомологичную рекомбинацию и хорошо известны в данной области (например, Wolfer et al., Trends Neurosci., 25:336-40 (2002)).

Выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии и/или ¹⁵ лигированы в экспрессирующий вектор для рекомбинантной продукции полипептидов по настоящему изобретению. Основные способы экспрессии рекомбинантных белков хорошо известны в данной области. Такие рекомбинантные белки могут экспрессироваться в растворимой форме для применения нарушений, происходящих ²⁰ из-за нарушенной регуляции иммунной системы; такие нарушения включают, например, злокачественные опухоли и инфекционные заболевания, и аутоиммунные нарушения и воспалительные заболевания, и отторжение трансплантата. Аутоиммунные нарушения и воспалительные заболевания включают, но без ограничения, ревматоидный артрит, энцефаломиелит, остеоартрит, рассеянный ²⁵ склероз, аутоиммунный гастрит, системную красную волчанку и другие воспалительные дерматозы, диабет I типа, астму, аллергию и воспалительные заболевания толстого кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит.

Подразумевается, что используемый экспрессирующий вектор относится к ³⁰ молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой он связан. Другим типом вектора является плаزمид, которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК-петле, в которую могут лигироваться дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут лигироваться в вирусный геном. ³⁵ Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном ⁴⁰ клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и за счет этого реплицируются вместе с геномом-хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначены в данном описании как рекомбинантные экспрессирующие векторы (или просто экспрессирующие векторы). В общем, экспрессирующие векторы, применяемые в ⁴⁵ способах рекомбинантной ДНК, часто находятся в виде плазмид. В настоящем описании плазмиды и векторы могут употребляться взаимозаменяемо, поскольку плазмиды являются наиболее часто используемым видом вектора. Однако подразумевается, что изобретение относится к другим видам экспрессирующих ⁵⁰ векторов, таким как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

В другом варианте осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению

применяют для создания агонистов GITR, например полипептидов GITRL, включая активные фрагменты и/или их слитые белки, которые также входят в объем изобретения. Например, полипептид GITRL или его активные фрагменты могут сливаться со второй группой, например, иммуноглобулином или его фрагментом (например, его связывающим Fc-фрагментом). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид включает в себя полноразмерный полипептид GITRL.

Альтернативно, первый полипептид может включать в себя меньше полноразмерного полипептида GITRL. Кроме того, растворимые формы GITRL могут сливаться через «линкерные» последовательности с Fc-частью иммуноглобулина. Другие слитые белки, такие как с глутатион-S-трансфераза (GST), Lex-A, тиоредоксин (TRX) или мальтозосвязывающий белок (MBP), также могут использоваться.

Слитые белки могут дополнительно включать с себя линкерную последовательность, соединяющую фрагмент GITRL или GITRL со второй группой. Применение таких линкерных последовательностей хорошо известно в данной области. Например, слитый белок может включать в себя пептидный линкер, например пептидный линкер длиной примерно 2-20, более предпочтительно менее 10 аминокислот. В одном из вариантов осуществления пептидный линкер может составлять 2 аминокислоты в длину.

В другом варианте осуществления слитый белок включает в себя гетерологичную сигнальную последовательность (т.е. полипептидную последовательность, которая не присутствует в полипептиде, кодируемом нуклеиновой кислотой GITRL) с его N-конца. Например, сигнальная последовательность из другого белка может сливаться с полипептидом GITRL, включая их активные фрагменты и/или слитые белки. В конкретных клетках-хозяевах (например, клетках-хозяевах млекопитающего), экспрессия и/или секреция GITRL может увеличиваться путем использования гетерологичной сигнальной последовательности.

Сигнальный пептид, который может включаться в состав слитого белка, представляет собой MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO:11). Если требуется, одна или несколько аминокислот может, кроме того, встраиваться между первым полипептидным радикалом, включающим в себя радикал GITRL, и вторым полипептидным радикалом. Второй полипептид предпочтительно растворим. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид усиливает период полужизни (например, период полужизни в сыворотке) связанного полипептида. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид включает в себя последовательность, которая облегчает ассоциацию слитого полипептида со вторым полипептидом GITRL. В предпочтительном осуществлении второй полипептид включает в себя, по меньшей мере, область иммуноглобулинового пептида. Полипептиды слияния иммуноглобулина известны в данной области и описаны, например, в патентах США № 5516964; 5225538; 5428130; 5514582; 5714147 и 5455165, которые включены в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

Химерный белок или слитый белок по изобретению может продуцироваться стандартными способами рекомбинантной ДНК. Например, фрагменты ДНК, кодирующие различные полипептидные последовательности, лигируют вместе в одну рамку считывания общепринятыми способами, например, путем использования тупых концов или липких концов для лигирования, расщепления ферментами рестрикции для обеспечения подходящих концов, подходящего заполнения липких концов, обработки щелочной фосфатазой во избежание нежелательного присоединения и ферментативного лигирования. В другом варианте осуществления ген слияния может

быть синтезирован общепринятыми способами, включая автоматизированные ДНК-синтезаторы. Альтернативно, ПЦР-амплификация генных фрагментов может проводиться с использованием якорных праймеров, которые дают начало комплементарным перекрываниям между двумя следующими друг за другом генными фрагментами, которые затем могут отжигаться и повторно амплифицироваться с образованием химерной генной последовательности (см., например, Ausubel et al. (Eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992).

Более того, многие экспрессирующие векторы, которые кодируют радикал слияния (например, Fc-область иммуноглобулиновой тяжелой цепи), доступны коммерчески. Кодирующая GITRL нуклеиновая кислота может клонироваться в такой экспрессирующий вектор, так что радикал слияния связан в рамку считывания с белком-иммуноглобулином. В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды GITRL существуют в виде олигомеров, таких как димеры или тримеры.

Некоторые клеточные линии могут действовать в виде подходящих клеток-хозяев для рекомбинантной экспрессии полипептидов по настоящему изобретению. Клеточные линии хозяина-млекопитающего включают в себя, например, клетки COS, клетки CHO, клетки 293T, клетки A431, клетки 3T3, клетки CV-1, клетки HeLa, клетки L, клетки BHK21, клетки HL-60, клетки U937, клетки NaK, клетки Jurkat, а также клеточные линии, полученные из культуры *in vitro* первичной ткани и первичных эксплантатов.

Альтернативно, может быть возможной рекомбинантная продукция полипептидов по настоящему изобретению в низших эукариотах, таких как дрожжи, или в прокариотах. Потенциально подходящие штаммы дрожжей включают в себя *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штаммы *Kluyveromyces* и штаммы *Candida*. Потенциально подходящие бактериальные штаммы включают в себя *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Salmonella typhimurium*. Если полипептиды по настоящему изобретению получены в дрожжах или бактериях, может быть необходимым модифицировать их, например, путем фосфорилирования или гликозилирования подходящих участков для придания функциональности. Такое ковалентное связывание может осуществляться с использованием хорошо известных химических или ферментативных способов.

Экспрессия в бактериях может приводить к образованию телец включения, содержащих рекомбинантный белок. Таким образом, рефолдинг рекомбинантного белка может потребоваться для продукции активного или более активного материала. Некоторые способы получения правильно свернутых гетерологичных белков из бактериальных телец включения известны в данной области. Данные способы в основном включают солиubilизацию белка из телец включения, с последующей полной денатурацией с использованием хаотропного средства. Когда в первичной аминокислотной последовательности белка присутствуют остатки цистеина, часто является необходимым выполнять рефолдинг в окружении, которое обеспечивает непосредственное образование дисульфидных связей (редокс-система). Основные способы рефолдинга описаны в Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185:187-95. В EP 0433225 и в заявке на патент США № 08/163877 описаны другие подходящие способы.

Полипептиды по настоящему изобретению могут также рекомбинантно продуцироваться путем функциональной связи выделенных полинуклеотидов по настоящему изобретению с подходящими последовательностями контроля в одном или нескольких экспрессирующих векторах насекомых, таких как бакуловирусные векторы, и с использованием экспрессирующей системы клеток насекомых.

Материалы и способы для экспрессирующих систем на основе бакуловируса/Sf9 доступны коммерчески в виде набора (например, набор MaxBac®, Invitrogen, Carlsbad, Калифорния).

Агонисты GITR, например белок GITRL, его активные фрагменты и/или слитый белок, могут быть получены путем выращивания культуры трансформированных клеток-хозяев в условиях культивирования, необходимых для экспрессии требуемого белка. После рекомбинантной экспрессии подходящих клеток-хозяев полипептиды по настоящему изобретению могут очищаться от культуральной среды или клеточных экстрактов с использованием известных методов очистки, таких как гель-фильтрация и ионообменная хроматография. Растворимые формы агонистов GITR, например белка GITRL, его активных фрагментов и/или слитого белка, могут очищаться из кондиционированной среды. Мембраносвязанные формы, например, белка GITRL по изобретению могут очищаться получением общей мембранной фракции из экспрессирующих клеток и экстракцией из мембран неионным детергентом, таким как Triton X-100. Очистка также может включать аффинную хроматографию со средствами, о которых известно, что они связывают полипептиды по настоящему изобретению. Данные способы очистки также могут быть использованы для очистки полипептидов по настоящему изобретению от других источников, включая природные источники. Как описано выше, агонисты GITR, например белок GITRL, его активные фрагменты и/или слитый белок, могут также экспрессироваться в виде продукта трансгенных животных, например, как компонент молока трансгенных коров, коз, свиней или овец, которые характеризуются соматическими или зародышевыми клетками, содержащими полинуклеотидную последовательность, кодирующую агонисты GITR.

Методы, которые могут быть использованы для очистки агонистов GITR, например белка GITRL, его активных фрагментов и/или слитого белка, известны специалистам в данной области. Например, белок GITRL по изобретению может быть концентрирован с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. После стадии концентрирования концентрат может быть помещен на очищающий матрикс, такой как среда для гель-фильтрации. Альтернативно, можно использовать анионообменную смолу, например, матрикс или субстрат, имеющие подвешенные диэтиламиноэтиловые (DEAE) или полиэтилениминовые (PEI) группы. Матрикс могут представлять собой акриламид, агарозу, декстран, целлюлозу или другие типы, обычно используемые при очистке белков. Альтернативно, может использоваться катионообменная стадия. Подходящие катионообменники включают различные нерастворимые матриксы, содержащие сульфопропильные или карбоксиметильные группы. Сульфопропильные группы являются предпочтительными (например, колонки с S-Sepharose®). Очистка агонистов GITR, например белка GITRL, его активных фрагментов и/или слитого белка, из культуральной надосадочной жидкости может также включать одну или несколько колоночных стадий на таких аффинных смолах, как конканавалин А-агароза, гепарин-Toyopearl® или Cibacron blue 3GA Sepharose®; или хроматографию гидрофобных взаимодействий с использованием таких смол, как фенилэфирная, бутилэфирная или пропилэфирная; или иммунно-аффинную хроматографию. Наконец, одна или несколько стадий высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) с применением гидрофобных сред для ОФ-ВЭЖХ, например силикагеля, имеющего навешенные метильные или другие алифатические

группы, могут быть использованы для дальнейшей очистки белка GITRL. Аффинные колонки, содержащие антитела против белка GITRL, также могут использоваться в очистке согласно известным способам. Некоторые из предшествующих стадий очистки в различных сочетаниях или с другими известными способами также могут использоваться для предоставления, по существу, очищенного выделенного рекомбинантного белка. Предпочтительно, выделенный белок GITRL очищен так, что он является, по существу, лишенным других белков млекопитающих.

Альтернативно, агонисты G1TR, например белок GITRL, его активные фрагменты и/или слитые белки, могут также рекомбинантно экспрессироваться в форме, которая облегчает очистку. Например, данные полипептиды могут экспрессироваться в виде слитых блков с такими белками, как мальтозосвязывающий белок (MBP), глутатион-S-трансфераза (GST) или тиоредоксин (TRX). Наборы для экспрессии и очистки таких слитых белков коммерчески доступны от New England BioLabs (Beverly, Массачусетс), Pharmacia (Piscataway, Нью-Джерси) и Invitrogen соответственно. Агонисты G1TR, например белок GITRL, его активные фрагменты и/или слитые белки, могут также быть мечены малым эпитопом и впоследствии идентифицированы с использованием специфического антитела против данного эпитопа.

Предпочтительным эпитопом является эпитоп FLAG, который коммерчески доступен от Eastman Kodak (New Haven, Коннектикут).

Агонисты G1TR, например белок GITRL, его активные фрагменты и/или слитые белки, могут также продуцироваться путем общепринятого химического синтеза. Способы химического синтеза таких полипептидов хорошо известны специалистам в данной области. Такие химически синтезированные полипептиды могут обладать биологическими свойствами общими с природными, очищенными полипептидами и, таким образом, могут применяться в качестве биологически активных или иммунологических заместителей для природных полипептидов.

Агонисты G1TR, например белок GITRL, его активные фрагменты и/или слитые белки, также включают молекулы, структурно отличные от описанных полипептидов (например, которые имеют несколько измененную последовательность), но которые имеют, по существу, те же самые биохимические характеристики, что и описанные полипептиды (например, изменены только в функционально несущественных аминокислотных остатках). Такие молекулы включают в себя встречающиеся в природе аллельные варианты и обдуманно сконструированные варианты, содержащие изменения, замены, перемещения, вставки или делеции. Способы таких изменений, замен, перемещений, вставок или делеций хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления полипептидный радикал GITRL предоставлен в виде полипептида-варианта GITRL, имеющего мутации во встречающейся в природе последовательности GITRL (дикий тип), что приводит к получению последовательности GITRL, более устойчивой к протеолизу (относительно немутированной последовательности).

Описанные способы получения агонистов G1TR, например белка GITRL, его активных фрагментов и/или слитых белков, могут использоваться для получения антагонистов G1TR, особенно растворимых белков G1TR, их активных фрагментов и/или слитых белков. Специалисту в данной области будет очевидно, что все, что требуется для получения антагонистов G1TR, например растворимого G1TR, его активных фрагментов и/или слитых белков, будет представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотную последовательность G1TR, причем обе они известны. С использованием данных

последовательностей антагонисты G1TR, например растворимый G1TR, его активные фрагменты и/или слитые белки, могут генерироваться с использованием способов рекомбинантной ДНК и/или химического синтеза, как описано выше.

Антитела против G1TRL

В других вариантах осуществления изобретение относится к антагонистам G1TR, таким как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с G1TRL, предпочтительно с G1TRL млекопитающего (например, мыши) и нейтрализуют активность G1TR.

Специалисту в данной области будет очевидно, что используемый здесь термин «антитело» относится к белку, содержащему, по меньшей мере, одну, предпочтительно две переменных области тяжелой (H) цепи (обозначаемые как VH), и, по меньшей мере, одну, предпочтительно две переменных области легкой (L) цепи (обозначаемые как VL). Области VH и VL могут далее подразделяться на области гипервариабельности, обозначенные «области, определяющие комплементарность» («CDR»), между которыми находятся области, которые являются более консервативными, называемые «каркасные области» («FR»). Содержание FR и CDR точно определено (см., Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242, и Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, включенные в данное описание в качестве ссылки). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, построенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Антитело может далее включать в себя константные области легкой и тяжелой цепи с образованием, таким образом, тяжелой и легкой иммуноглобулиновой цепи соответственно. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой тетрамер двух тяжелых иммуноглобулиновых цепей и двух легких иммуноглобулиновых цепей, в котором тяжелые и легкие иммуноглобулиновые цепи связаны между собой, например, дисульфидными связями. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Вариабельная область легкой и тяжелой цепей состоит из связывающего домена, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Иммуноглобулин относится к белку, состоящему из одного или нескольких полипептидов, по существу, кодируемых иммуноглобулиновыми генами. Распознаваемые гены человеческого иммуноглобулина включают в себя гены константных областей каппа, лямбда, альфа (IgA1 и IgA2), гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эпсилон и мю, а также мириады генов вариабельных областей иммуноглобулинов. Полноразмерные «легкие цепи» иммуноглобулинов (примерно 25 кД, или 214 аминокислот) кодируются геном вариабельной области с NH₂-конца (примерно 110 аминокислот) и геном константной области каппа или лямбда с COOH-конца. Полноразмерные иммуноглобулиновые «тяжелые цепи» (примерно 50 кД, или 446 аминокислот) сходным образом кодируются геном вариабельной области (примерно 116 аминокислот) и одним из других указанных выше генов константной области, например гамма (кодирует примерно 330 аминокислот). Гены константных областей тяжелых цепей иммуноглобулина кодируют класс антитела, т.е. изотип (например, IgM или IgG1). Антигенсвязывающий фрагмент антитела (или просто

«часть антитела» или «фрагмент»), используемый здесь, относится к одному или нескольким фрагментам полноразмерного антитела, которые сохраняют способность специфично связывать антиген (например, CD3). Примеры связывающих фрагментов, охваченные термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают в себя (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, состоящий из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-46), который состоит из домена VH; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с использованием рекомбинантных способов синтетическим линкером, который позволяет им составлять одну белковую цепь, в которой VL и VH области образуют пару с получением одновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-26; и Huston et al. (1988) Proc.Natl. Acad. Sci. USA: 85:5879-83). Такие одноцепочечные антитела, как подразумевается, также охватываются термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Данные фрагменты антигена получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу при использовании таких же методик, как и для интактных антител.

Специалисту в данной области будет очевидно, что описанные здесь способы получения молекул антитела против полипептидов по настоящему изобретению, например мышинового GITRL, могут также использоваться для получения молекул антитела против других белков, например GITR или человеческого GITRL. Следовательно, способы получения молекул антитела относятся не только к полипептидам по настоящему изобретению, как описано, но также, например, к GITR или человеческому GITRL.

Молекулы антитела против полипептидов по настоящему изобретению, например, нейтрализующие антитела против мышинового GITRL, включающие, но без ограничения, мышинный GITRL и его гомологи, могут использоваться при профилактике или лечении аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний, отторжения трансплантата и сходных или родственных нарушений. Другие молекулы антитела, например агонистические антитела против GITR, могут использоваться по способам изобретения для лечения злокачественной опухоли, инфекционных заболеваний и сходных или родственных нарушений. Такие молекулы антитела могут продуцироваться способами, хорошо известными специалистам в данной области. Например, моноклональные антитела могут продуцироваться путем образования гибридом хорошо известными способами. Гибридомы, образованные таким способом, затем подвергают скринингу с использованием стандартных способов, таких как сорбционный иммуноферментный анализ (ELISA), для идентификации одной или нескольких гибридом, которые продуцируют антитело, специфично связывающееся с полипептидами по настоящему изобретению. Например, белки GITRL по изобретению могут также использоваться для иммунизации животных для получения поликлональных и моноклональных антител, которые специфично взаимодействуют с белком GITRL и которые могут ингибировать связывание лигандов с рецептором, т.е. GITR. Сходным образом, белки GITR также могут использоваться для получения поликлональных и моноклональных антител, которые специфично взаимодействуют

с GITR. Пептидные иммуногены, кроме того, могут содержать остаток цистина с С-конца и могут конъюгироваться с гаптенем, таким как гемоцианин морского блюдечка (KLH). Дополнительные пептидные иммуногены могут генерироваться путем замещения остатков тирозина сульфатированными тирозиновыми остатками.

Способы синтеза таких пептидов известны в данной области, например, как в Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54; Krstenansky et al. (1987) FEBS Lett. 211: 10. Полноразмерный полипептид по настоящему изобретению может использоваться в качестве иммуногена или, альтернативно, могут использоваться антигенные пептидные фрагменты данных полипептидов. Антигенный пептид из полипептида по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, 7 непрерывных аминокислотных остатков и включает эпитоп, так что антитело, полученное против данного пептида, образует специфичный иммунный комплекс с данным полипептидом.

Предпочтительно антигенный пептид включает, по меньшей мере, 10 аминокислотных остатков, более предпочтительно, по меньшей мере, 15 аминокислотных остатков, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 20 аминокислотных остатков и наиболее предпочтительно по меньшей мере, 30 аминокислотных остатков.

Моноклональные антитела могут быть получены другими способами, известными специалисту в области технологии рекомбинантной ДНК. В качестве альтернативы получения секретирующих моноклональные антитела гибридом моноклональное антитело против полипептида по настоящему изобретению может быть идентифицировано и выделено путем скрининга рекомбинантной комбинаторной библиотеки иммуноглобулина (например, антительного фагового дисплея) полипептидом по настоящему изобретению (например, GITRL) или GITR, с выделением, таким образом, представителей библиотеки иммуноглобулинов, которые связываются с полипептидами по настоящему изобретению или с GITR соответственно. Способы и коммерчески доступные наборы для получения и скрининга библиотек фагового дисплея хорошо известны специалистам в данной области. Кроме того, примеры способов и реагентов, особенно подходящих для применения при получении и скрининге библиотек антительного дисплея, могут быть найдены в литературе. Например, способ «комбинаторного антительного дисплея» был разработан для идентификации и выделения фрагментов антител, имеющих особую специфичность в отношении антигена, и может использоваться для продукции моноклональных антител (для описания комбинаторного антительного дисплея см., например, Sastry et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728; Huse et al. (1989) Science 246:1275; Orlandi et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833). После иммунизации животного иммуногеном, как описано выше, клонировали репертуар антител из полученных в результате объединенных В-клеток. Способы получения последовательности ДНК переменных областей разнообразных популяций иммуноглобулиновых молекул с использованием смеси олигомерных праймеров и ПЦР. Например, смешанные олигонуклеотидные праймеры, соответствующие 5'-концевым лидерным (сигнальный пептид) последовательностям и/или последовательностям каркаса 1 (FR1), а также праймеры к консервативной 3'-концевой области могут использоваться для ПЦР-амплификации переменных областей легких и тяжелых цепей из некоторого количества мышинных антител (Larrick et al. (1991) Biotechniques 11:152-56). Аналогичную стратегию можно также использовать для амплификации переменных областей легких и тяжелых цепей из человеческих антител (Larrick et al. (1991) Methods: Companion to Methods in Enzymology 2: 106-10).

Поликлональные сыворотки и антитела могут продуцироваться иммунизацией подходящего субъекта полипептидом по настоящему изобретению. Титр антитела у иммунизированного субъекта может быть подвергнут мониторингу в течение времени стандартными способами, такими как ELISA с использованием иммобилизованного маркерного белка. Если требуется, молекулы антитела, направленные против полипептида по настоящему изобретению, могут быть выделены из субъекта или культуральной среды и далее очищены хорошо известными методами, такими как хроматография на белке А, с получением фракции IgG.

Фрагменты антител к полипептидам по настоящему изобретению могут быть получены путем расщепления антител по способам, хорошо известным в данной области. Например, иммунологически активные Fab- и F(ab')₂-фрагменты могут быть получены обработкой антител ферментом, таким как пепсин.

Кроме того, химерные, гуманизированные и одноцепочечные антитела по настоящему изобретению, включающие в себя относящиеся к человеку и не относящиеся к человеку части, могут продуцироваться с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК и/или рекомбинантной комбинаторной библиотеки иммуноглобулинов. Гуманизированные антитела также могут продуцироваться с использованием трансгенных мышей, не способных экспрессировать эндогенные гены иммуноглобулиновых легких и тяжелых цепей, но способных экспрессировать человеческие гены легких и тяжелых цепей. Например, человеческие моноклональные антитела (mAb), направленные против GITRL, могут генерироваться с использованием трансгенных мышей, несущих иммуноглобулиновые гены человека, а не мышинные иммуноглобулиновые гены. Спленоциты данных трансгенных мышей, иммунизированных интересующим антигеном, могут затем использоваться для продукции гибридом, которые секретируют человеческие mAb со специфичными аффинностями в отношении эпитопов из человеческого белка (см., например, Wood et al., WO 91/00906; Kucheralapati et al., WO 91/10741; Lonberg et al. WO 92/03918; Kay et al., WO 92/03917; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856-59; Green et al. (1994) Nat. Genet. 7:13-21; Morrison et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55; Bruggeman (1993) Year Immunol 7:33-40; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-24; Bruggeman et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21:1323-26).

Химерные антитела, включающие химерные иммуноглобулиновые цепи, могут продуцироваться посредством способов рекомбинантной ДНК, известных в данной области. Например, ген, кодирующий константную область Fc молекулы мышинного (или относящегося к другому виду) моноклонального антитела, расщепляют ферментами рестрикции с удалением области, кодирующей мышинный Fc, и замещают эквивалентной частью гена, кодирующего константную область человеческого Fc (см. Robinson et al., публикация Международного патента PCT/US86/02269; Akira, et al., заявка на Европейский патент 184187; Taniguchi, заявка на Европейский патент 171496; Morrison et al., заявка на Европейский патент 173494; Neuberger et al., WO 86/01533; Cabilly et al., патент США № 4816567; Cabilly et al., заявка на Европейский патент 125023; Better et al. (1988) Science 240:1041-43; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-43; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-26; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-18; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314: 446-49; и Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-59).

Антитело или иммуноглобулиновая цепь могут гуманизироваться способами, известными в данной области. Гуманизированные антитела, включающие в себя гуманизированные иммуноглобулиновые цепи, могут генерироваться путем замены

последовательностей вариабельной области Fv, которые непосредственно не вовлечены в связывание антигена, эквивалентными последовательностями из человеческой вариабельной области Fv. Общие способы получения гуманизированных антител предоставлены Morrison (1985) Science 229:1202-07; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; Queen et al., патенты США № 5585089; 5693761; 5693762, содержание которых включено в данное описание в качестве ссылки. Данные способы включают выделение, манипуляцию и экспрессию последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют все или части иммуноглобулиновых вариабельных областей Fv, по меньшей мере, из одной из тяжелой или легкой цепи. Источники таких нуклеиновых кислот хорошо известны специалистам в данной области и, например, могут быть получены из гибридомы, продуцирующей антитело против ранее определенной мишени. Рекомбинантная ДНК, кодирующая гуманизированное антитело, или ее фрагмент, может затем клонироваться в подходящий экспрессирующий вектор.

Гуманизированные молекулы антитела, или иммуноглобулины, или молекулы антитела с пересаженными CDR могут продуцироваться путем пересадки CDR или замены CDR, где может пересаживаться одна, две или все CDR иммуноглобулиновой цепи. См., например, патент США 5225539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-25; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534; Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-60; Winter, патент США № 5225539, содержание которых включено в данное описание в качестве ссылки. Winter описывает способ пересадки CDR, который может применяться для получения гуманизированных антител по настоящему изобретению (заявка на патент Великобритании GB 2188638A; Winter, патент США № 5225539), содержание которых включено в данное описание в качестве ссылки. Все CDR конкретного человеческого антитела могут быть заменены, по меньшей мере, частью не относящегося к человеку CDR, или только некоторые из данных CDR могут быть заменены не относящимися к человеку CDR. Необходимо заменять только такое количество CDR, которое необходимо для связывания гуманизированного антитела к определенному ранее антигену.

Моноклональные, химерные или гуманизированные антитела, модифицированные, например, делецией, добавлением или заменой других частей антитела, например константной области, также входят в объем изобретения. Например, антитело может быть модифицировано следующим образом: (i) делецией константной области; (ii) заменой константной области другой константной областью, например, константной областью, предназначенной для увеличения периода полужизни, стабильности или сродства антитела, или константной областью из другого вида или класса антител; или (iii) модификацией одной или нескольких аминокислот в константной области для изменения, например, числа участков гликозилирования, функции эффекторных клеток, связывания с Fc-рецептором (FcR), фиксации комплемента и т.д.

Способы изменения константной области антитела известны в данной области. Антитела с измененной функцией, например, измененным сродством в отношении эффекторного лиганда, такого как FcR на клетке или C1-компонент комплемента, могут продуцироваться путем замены, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в константной области антитела другим остатком (см., например, EP 388151 A1, патент США 5624821 и патент США 5648260, содержание которых включено в данное описание в качестве ссылки). Сходные типы изменений мышинового (или относящегося к другому виду) иммуноглобулина могут применяться для снижения или элиминации данных функций. Такие изменения известны в данной области.

Например, возможно изменить сродство Fc-области антитела (например, IgG,

такого как человеческого IgG) в отношении FcR (например, Fc гамма R1) или сродство в отношении связывания C1q путем замены конкретного(ых) остатка(ов) остатком(ами), имеющим(ими) подходящую функциональную группу на его боковой цепи, или путем введения заряженной функциональной группы, такой как глутамат или аспартат, или ароматического неполярного остатка, такого как фенилаланин, тирозин, триптофан или аланин (см., например, патент США 5624821).

Антитела против GITRL по изобретению могут использоваться для выделения, очистки и/или детекции полипептидов GITRL в надосадочной жидкости, клеточном лизате или на клеточной поверхности. Антитела, описанные в данном изобретении, также могут использоваться в диагностике для мониторинга уровня белка GITRL как часть процедуры клинического тестирования или в клинике для направленного действия на терапевтический модулятор в клетке или ткани, содержащей антиген антитела GITRL. Например, терапевтическое средство, такое как малая молекула, или другое терапевтическое средство по изобретению может связываться с антителом GITRL для направленного действия данного терапевтического средства на клетку или ткань, экспрессирующую GITRL. Связывание нейтрализующих или не нейтрализующих антител (предпочтительно моноклональные антитела) с белком GITRL может также использоваться при лечении состояний, включающих в себя нарушенную регуляцию иммунной системы, например аутоиммунных заболеваний. Данные нейтрализующие моноклональные антитела могут быть способными блокировать связывание GITRL с G1TR. Настоящее изобретение далее относится к композициям, содержащим антитело, которое специфично взаимодействует с GITRL. Сходным образом, антитела против G1TR могут быть полезны при выделении, очистке и/или детекции G1TR, диагностического мониторинга уровня G1TR, или клинического направленного действия терапевтического модулятора на клетку или ткань, содержащие G1TR. Агонистические антитела против G1TR (предпочтительно, моноклональные антитела) могут также использоваться для лечения состояний, включающих нарушенную регуляцию иммунной системы, например, злокачественную опухоль или инфекционные заболевания. Данные агонистические антитела могут индуцировать активность G1TR. Таким образом, настоящее изобретение далее относится к композициям, содержащим антитело к G1TR.

Анализы по скринингу GITRL

Полинуклеотиды и полипептиды по настоящему изобретению могут использоваться в анализах по скринингу с целью идентификации фармакологических средств или соединений-прототипов средств, которые способны модулировать активность GITRL и, таким образом, G1TR в клетке или организме и за счет этого являются регуляторами иммунных реакций. Например, образцы, содержащие GITRL (природный или рекомбинантный), могут контактировать с одним из множества тестируемых соединений (или биологических средств или малых органических молекул), и активность GITRL в каждом из обработанных образцов можно сравнивать с активностью GITRL в необработанных образцах или в образцах, контактировавших с различными тестируемыми соединениями. Такие сравнения определяют, приводит ли какое-либо из тестируемых соединений к: 1) существенно снижению уровню экспрессии или активности GITRL, что таким образом указывает на ингибитор GITRL (например, соединение, которое сохраняет или усиливает иммунную супрессию), или 2) существенному повышенному уровню экспрессии или активности GITRL, что таким образом указывает на активатор GITRL (например,

соединение, которое отменяет иммунную супрессию). В одном из вариантов осуществления идентификацию тестируемых соединений, способных модулировать активность GITRL, проводят с использованием высокопроизводительных анализов скрининга, например анализов BIACORE® (Biacore International AB, Упсала, Швеция), BRET (перенос энергии резонанса биолюминесценции) и FRET (флуоресценции с переносом энергии резонанса), а также ELISA и основанных на клетках анализов.

Малые молекулы

Сниженная активность GITR в организме (или у субъекта), страдающем аутоиммунными нарушениями, воспалительными заболеваниями или отторжением трансплантата (или при их риске), или в клетках из такого организма (или субъекта), вовлеченных в такие нарушения, может также достигаться посредством применения малых молекул (обычно органических малых молекул), которые являются антагонистами, т.е. ингибируют активность GITR. Новые малые молекулы-антагонисты могут идентифицироваться способами скрининга, описанными выше, и могут использоваться в способах лечения по настоящему изобретению, описанных ниже. Наоборот, повышенная активность GITR в организме (или у субъекта), страдающем злокачественной опухолью или инфекционным заболеванием (или при его риске), или в клетке из такого организма (или субъекта), вовлеченных в такие нарушения, может также достигаться посредством применения малых молекул (обычно органических малых молекул), которые являются агонистами, т.е. усиливают активность GITR. Новые малые молекулы-антагонисты могут идентифицироваться способами скрининга, описанными выше, и могут использоваться в способах лечения злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, описанных ниже.

Способы диагностики, прогноза и мониторинга прогресса аутоиммунных нарушений и злокачественных опухолей

В данной области хорошо известно, что иммунологические механизмы, исследованные на экспериментальных животных, особенно на мышах, могут переноситься и часто переносятся на иммунную систему человека. По существу, хотя описанные здесь примеры демонстрируют роль GITR в иммунной супрессии CD4⁺CD25⁺ регуляторными клетками на мышинной модели, описанные способы диагностики, прогнозирования и мониторинга нарушений, связанных с нарушенной регуляцией иммунной системы, например аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, и злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний, могут, в частности, использоваться для диагностики, прогноза и мониторинга таких заболеваний у людей. При воплощении описанных способов специалисту в данной области будет очевидно, что человеческие гомологи GITR и GITRL, а также человеческие агонисты и антагонисты GITR могут использоваться в заявленных способах диагностики, прогнозирования и мониторинга таких нарушений у людей.

Настоящее изобретение относится к способам диагностики, прогноза и мониторинга прогресса аутоиммунных нарушений у субъекта (например, в которых прямо или опосредованно участвует повышение уровня GITRL) путем выявления положительной регуляции активности GITR, например путем выявления положительной регуляции GITRL, включая, но без ограничения, применение таких способов на субъектах-людях. Специалисту в данной области будет очевидно, что данные способы могут применяться в отношении воспалительных заболеваний, а также отторжения трансплантата. Данные способы могут проводиться путем

использования предварительно упакованных диагностических наборов, содержащих, по меньшей мере, одно соединение из группы, включающей полинуклеотид GITRL или его фрагменты, полипептид GITRL или его фрагменты (включая слитые белки), или антитела против полипептидов GITRL или их производных, или описанных здесь модуляторов полинуклеотидов и/или полипептидов GITRL, которые могут подходящим образом применяться, например, в клинических условиях. Кроме того, специалисту в данной области будет очевидно, что положительная регуляция GITRL может также выявляться непрямыми способами, такими как подсчет числа иммунных клеток.

«Диагностический» или «диагностирование» означает идентификацию наличия или отсутствия патологического состояния. Диагностические способы включают детекцию положительной регуляции GITRL путем определения тестируемого количества продукта гена GITRL (например, мРНК, кДНК или полипептида, включая их фрагменты) в биологическом образце от субъекта (человека или не относящегося к человеку млекопитающего) и сравнения тестируемого количества с нормальным количеством или интервалом (т.е. количеством или интервалом для индивидуума(ов), о котором(ых) известно, что он(и) не страдает(ют) от аутоиммунных заболеваний) генного продукта GITRL. Хотя конкретный способ диагностики может не предоставлять определительный диагноз аутоиммунных нарушений, бывает достаточно того, что способ предоставляет позитивное указание на то, которое способствует постановке диагноза.

Настоящее изобретение также относится к способам прогноза таких аутоиммунных нарушений путем выявления положительной регуляции активности GITR, например, путем выявления положительной регуляции GITRL. «Прогностический» или «прогнозирование» означает предсказание возможного развития и/или тяжести патологического состояния. Способы прогноза включают определение тестируемого количества продукта гена GITRL в биологическом образце от субъекта и сравнение тестируемого количества с прогностическим количеством или интервалом (т.е. количеством или интервалом для индивидуумов с различной тяжестью аутоиммунных нарушений) продукта гена GITRL. Различные количества продукта гена GITRL в тестируемом образце согласуются с конкретными прогнозами аутоиммунных нарушений. Выявление количества продукта гена GITRL на конкретном прогностическом уровне обеспечивает прогноз для субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способам мониторинга прогресса или курса таких аутоиммунных нарушений путем выявления позитивной регуляции активности GITR, например, путем выявления положительной регуляции GITRL. Способы мониторинга включают определение тестируемого продукта гена GITRL в биологических образцах, взятых от субъекта в первый или второй раз, и сравнение данных количеств. Изменение количества продукта гена GITRL от первого раза ко второму указывает на изменение в ходе аутоиммунных заболеваний при снижении количества, указывающем на ремиссию аутоиммунных нарушений, и при повышении количества, указывающем на прогрессию аутоиммунных заболеваний. Такие анализы по мониторингу также могут использоваться для оценки эффективности конкретного терапевтического вмешательства в организм пациентов, которых лечат от аутоиммунных заболеваний.

Повышенная экспрессия GITRL в способах, описанных выше, может выявляться в различных биологических образцах, включая жидкости организма (например, цельную кровь, плазму и мочу), клетки (например, цельные клетки, клеточные

фракции и клеточные экстракты) и ткани. Биологические образцы включают срезы ткани, такие как биопсии и замороженные срезы, взятые для гистологических целей. Предпочтительные биологические образцы включают кровь, плазму, лимфу, биопсии ткани, мочу, ЦСЖ (цереброспинальную жидкость), синовиальную жидкость и БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж). Следует понимать, что анализ биологических образцов не обязательно требует выделения клеток или ткани от субъекта. Например, подходящие средства для меченя, которые связывают продукты гена GITRL (например, антитела, нуклеиновые кислоты), могут вводиться субъекту и визуализироваться (при связывании с мишенью) с использованием стандартной технологии получения изображения (например, САТ, ЯМР (MRI) и PET).

В диагностических и прогностических анализах по настоящему изобретению продукт гена GITRL выявляют и подвергают количественному анализу с получением тестируемого количества. Затем тестируемое количество сравнивают с нормальным количеством или интервалом. Количество, значительно превышающее нормальное количество или интервал, представляет собой положительный признак в диагностике аутоиммунных нарушений. Конкретные способы выявления и количественного анализа генных продуктов GITRL описано ниже.

Нормальные количества или фоновые уровни продуктов гена GITRL могут определяться для любого конкретного типа образца и популяции. В общем, фоновые (нормальные) уровни белка или мРНК GITRL определяют измерением количества белка или мРНК GITRL в типе биологического образца от нормальных (т.е. здоровых) субъектов. Альтернативно, нормальные уровни генного продукта GITRL могут определяться путем измерения данного количества в здоровых клетках или тканях, взятых от того же субъекта, из которого взяты поврежденные (или, возможно, поврежденные) тестируемые клетки или ткани. Количество генного продукта GITRL (нормальное количество или тестируемое количество) может определять или выражаться в количестве относительно числа клеток, количества общего белка, объема. Для определения количества клеток в образце можно измерить конститутивно экспрессируемый генный продукт или другой генный продукт, экспрессируемый на известном уровне в клетках типа, из которого взят биологический образец.

Следует понимать, что способы анализа по настоящему изобретению необязательно требуют измерения абсолютных значений продукта гена GITRL, поскольку относительного количества достаточно для многих применений данных способов. Также следует понимать, что кроме количества или обилия продуктов гена GITRL варианты продуктов гена GITRL, или его аномальные продукты, или их профили экспрессии (например, мутированные транскрипты, укороченные полипептиды) могут быть идентифицированы путем сравнения нормальных генных продуктов и профилей экспрессии.

Диагностические, прогностические анализы и анализы по мониторингу по настоящему изобретению включают выявление и количественный анализ продуктов гена GITRL в биологических образцах. Продукты гена GITRL включают в себя мРНК GITRL и полипептид GITRL, и оба могут измеряться с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области.

Например, мРНК GITRL может непосредственно выявляться и подвергаться количественному анализу с использованием анализов, основанных на гибридизации, например, на нозерн-гибридизации, гибридизации *in situ*, дот- и слот-блотов и олигонуклеотидных чипов. Основанные на гибридизации анализы относятся к анализам, в которых зонд из нуклеиновой кислоты гибридизуется с нуклеиновой

кислотой-мишенью. В некоторых форматах мишень, зонд или оба иммобилизованы. Иммобилизованная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, РНК или другой олигонуклеотид или полинуклеотид и может включать в себя встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе нуклеотиды, нуклеотидные аналоги или осто-
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

30
 35
 40
 45
 50

45
 50

50

участвует снижение уровня GITRL) путем выявления отрицательной регуляции активности G1TR, например путем выявления отрицательной регуляции GITRL, включая, но без ограничения, применение таких способов на субъектах-людях.

Применение GITRL и родственных молекул для лечения

5 Авторы полагают, что они являются первыми, кто обнаружил, что связывание G1TR на эффекторных Т-клетках за счет GITRL или других агонистов G1TR предоставляет костимуляторный сигнал в отношении эффекторных Т-клеток, в которых данный сигнал делает эффекторные Т-клетки менее чувствительными в отношении

10 супрессии CD4⁺CD25⁺ регуляторными Т-клетками и повышает способность эффекторных Т-клеток пролиферировать в ответ на анти-CD3 или другие активирующие сигналы. Хотя для раскрытия данного механизма использовали экспериментальных мышей, в данной области хорошо известно, что

15 иммунологические механизмы, исследованные на экспериментальных мышах, могут переноситься и часто переносятся на иммунную систему человека. Как таковые, описанные способы применения GITRL и родственных молекул, т.е. агонистов G1TR или антагонистов G1TR, для лечения нарушений, связанных с нарушенной регуляцией иммунной системы, например аутоиммунных нарушений, воспалительных

20 заболеваний и отторжения трансплантата, и злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний, могут, в частности, использоваться для диагностики, прогноза и мониторинга таких заболеваний у людей. При воплощении описанных способов специалисту в данной области будет очевидно, что человеческие гомологи G1TR и GITRL, а также человеческие агонисты и антагонисты G1TR могут

25 использоваться в заявленных способах применения GITRL и родственных GITRL молекул, т.е. агонистов или антагонистов G1TR, при лечении аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, и злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний у людей.

30 Описанные здесь родственные GITRL молекулы, т.е. агонисты и антагонисты G1TR, включающие модуляторы активности полинуклеотида и/или полипептида GITRL, идентифицированные способами, описанными выше, могут применяться *in vitro*, *ex vivo* или включенными в фармацевтические композиции и введенными субъектам *in vivo* для лечения, например, аутоиммунных заболеваний путем введения

35 антагонистов G1TR (например, ингибиторных полинуклеотидов GITRL, низкомолекулярных антагонистов, нейтрализующих антител против G1TR и/или нейтрализующих антител против GITRL), или, например, злокачественных опухолей введением агониста G1TR (например, полинуклеотидов GITRL, полипептидов GITRL

40 или их слитых белков, низкомолекулярных агонистов и/или агонистических антител против G1TR). Такие GITRL и/или связанные с ним молекулы (включая модуляторы) включают, но без ограничения, мышинный GITRL и его гомологи (и антитела к таким молекулам), и такие гомологи включают, но без ограничения, человеческий GITRL. Некоторые подходы фармакогеномики, подлежащие рассмотрению при определении

45 того, следует ли вводить GITRL и/или родственные GITRL молекулы, хорошо известны специалистам в данной области и включают в себя ассоциации в пределах всего генома, подход ген-кандидат и профилирование генной экспрессии. Фармацевтическая композиция по изобретению составляется таким образом, чтобы быть совместимой с

50 предназначенным ей путем введения (например, пероральные композиции, в общем, содержащей инертный разбавитель или съедобный носитель). Другие не ограничивающие примеры путем введения включают парентеральное (например, внутривенное), внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляция),

чрескожное (местное), введение через слизистые и ректальное введение.

Фармацевтические композиции, совместимые с каждым из предназначенных путей введения, хорошо известны в данной области.

Агонисты или антагонисты G1TR могут применяться в виде фармацевтических композиций в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут содержать, в дополнение к агонистам или антагонистам G1TR и носителю, различные разбавители, наполнители, соли, буферы, стабилизаторы, солюбилизаторы и другие вещества, хорошо известные в данной области. Термин «фармацевтически приемлемый» означает нетоксичный материал, который не снижает эффективность биологической активности активного(ых) ингредиента(ов).

Характеристики носителя зависят от пути введения.

Фармацевтические композиции по изобретению могут также содержать цитокины, лимфокины или другие кроветворные факторы, такие как M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, G-CSF, фактор стволовых клеток и эритропоэтин. Фармацевтическая композиция может также включать антитела против цитокинов, как более подробно описано ниже.

Фармацевтическая композиция может содержать тромболитические или антитромбозные факторы, такие как активатор плазминогена и фактор VIII.

Фармацевтическая композиция может далее содержать противовоспалительные средства, как более подробно описано ниже. Такие дополнительные факторы и/или средства могут быть включены в фармацевтическую композицию с целью продукции синергического эффекта с агонистами или антагонистами G1TR или для минимизации побочных эффектов, вызванных агонистами или антагонистами G1TR. Наоборот, агонисты или антагонисты G1TR могут быть включены в препараты конкретного цитокина, лимфокина, другого фактора гемопоэза, тромболитического или антитромбозного фактора, или противовоспалительного средства для минимизации побочных эффектов цитокина, лимфокина, тромболитического или антитромбозного фактора, или противовоспалительного средства.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть в виде липосомы, в которой сочетаются агонисты или антагонисты G1TR, в дополнение к другим фармацевтически приемлемым носителям, с амфипатическими средствами, такими как липиды, которые существуют в агрегированной форме в виде мицелл, нерастворимых монослоев, жидких кристаллов или ламеллярных слоев в водном растворе.

Подходящие для липосомного препарата липиды включают, без ограничения, моноглицериды, диглицериды, сульфатиды, лизолецитин, фосфолипиды, сапонин, желчные кислоты и т.д. Получение таких липосомных препаратов находится на уровне техники, существующем в данной области, как описано, например, в патенте США № 4235871; патенте США № 4501728; патенте США № 4837028 и патенте США № 4737323, которые включены в данное описание в качестве ссылки.

Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» означает общее количество каждого активного компонента фармацевтической композиции или способа, которого достаточно для того, чтобы показать значимое преимущество для пациента, например ослабление симптомов, выздоровление или увеличение скорости выздоровления от таких состояний. При применении в отношении индивидуального активного ингредиента, вводимого отдельно, данный термин относится только к данному ингредиенту. При применении в отношении комбинации, данный термин относится к сочетанным количествам активных ингредиентов, которые приводят к терапевтическому действию, вводятся ли они в сочетании, серийно или одновременно.

При воплощении способа лечения или применения по настоящему изобретению терапевтически эффективное количество агониста G1TR (например, полинуклеотида G1TRL или полипептида G1TRL, экспрессируемого с него) или антагониста G1TR (например, нейтрализующего антитела против G1TRL или

5 нейтрализующего антитела против G1TR) вводят субъекту, например млекопитающему (например, человеку). Агонист или антагонист G1TR могут вводиться в соответствии со способом по изобретению отдельно или в комбинации с другими вариантами лечения, такими как варианты лечения с использованием

10 цитокинов, лимфокинов или других факторов гемопоэза или противовоспалительных средств. При совместном введении с одним или несколькими средствами агонисты или антагонисты G1TR могут вводиться одновременно со вторым средством или последовательно. При последовательном введении лечащий врач принимает решение по подходящей последовательности введения, например, полипептида G1TRL (или его

15 слитого белка) или нейтрализующего антитела против G1TRL в комбинации с другими средствами.

При пероральном введении терапевтически эффективного количества агониста или антагониста G1TR связующее средство находится в виде таблетки, капсулы, порошка, раствора или эликсира. При введении в виде таблетки фармацевтическая композиция по изобретению может, кроме того, содержать твердый носитель, такой как желатин или адьювант. Таблетка, капсула и порошок содержат примерно от 5 до 95%

20 связующего средства, и предпочтительно примерно от 25 до 90% связующего средства. При введении в жидкой форме может добавляться твердый носитель, такой как вода, нефть, масла животного или растительного происхождения, минеральное масло, соевое масло или кунжутное масло или синтетические масла. Жидкая форма фармацевтической композиции может дополнительно содержать физиологический

25 солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. При введении в жидкой форме фармацевтическая композиция содержит примерно от 0,5 до 90% по массе связующего средства и предпочтительно примерно от 1 до 50% по массе связующего средства.

Когда терапевтически эффективное количество агониста или антагониста G1TR

35 вводят путем внутривенной, кожной или подкожной инъекции, агонист или антагонист G1TR находится в виде свободного от пирогенов, приемлемого для парентерального введения водного раствора. Получение таких приемлемых для парентерального введения белковых растворов, имеющих должные

40 характеристики pH, изотоничности, стабильности и тому подобное, известно специалистам в данной области. Предпочтительная фармацевтическая композиция для внутривенной, кожной или подкожной инъекции должны содержать, в дополнение к агонисту или антагонисту G1TR, изотонический носитель, такой как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, декстро́за для инъекций, декстро́за и хлорид

45 натрия для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций или другой носитель, известный в данной области. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может также содержать стабилизаторы, консерванты, буферы, антиоксиданты или другие добавки, известные специалистам в данной области.

Количество агониста или антагониста G1TR в фармацевтической композиции по настоящему изобретению зависит от природы и тяжести подлежащего лечению

50 состояния и от природы предварительных способов лечения, которые претерпел пациент. Наконец, лечащий врач может принять решение по количеству агониста или

антагониста GITR, которым лечить каждого индивидуального пациента. Сначала лечащий врач будет вводить малые дозы агониста или антагониста GITR и будет наблюдать ответ пациента. Большие дозы агониста или антагониста GITR могут вводиться до получения от пациента оптимального терапевтического эффекта, и в
 5 данной точке дозировку в основном далее не повышают. Предполагается, что различные фармацевтические композиции, применяемые для воплощения способов настоящего изобретения, должны содержать примерно от 0,1 мкг до 100 мг, например, полипептида GITRL или нейтрализующего антитела против GITRL на кг массы тела.

10 Длительность внутривенной (в./в.) терапии с использованием фармацевтической композиции по настоящему изобретению изменяется в зависимости от тяжести подлежащего лечению заболевания и состояния и потенциальной реакции идиосинкразии каждого индивидуального пациента. Предполагается, что
 15 длительность каждого применения агониста или антагониста GITR может находиться в интервале от 12 до 24 часов непрерывного в./в. введения. Также предполагается подкожная (п./к.) терапия с использованием фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Данные варианты лечения могут проводиться ежесуточно, еженедельно или, более предпочтительно, раз в две недели или ежемесячно. Также
 20 предполагается, что агонист или антагонист GITR представляет собой малую молекулу, причем данные способы лечения могут вводиться ежесуточно, два раза в сутки, три раза в сутки и т.д. Наконец, лечащий врач принимает решение по подходящей длительности в./в. или п./к. лечения малой молекулой и временному согласованию лечения с использованием фармацевтической композиции по
 25 настоящему изобретению.

Полинуклеотиды и белки по настоящему изобретению, как ожидается, характеризуются одним или несколькими вариантами применения биологической активности (включая ассоциированные с указанными здесь способами анализа),
 30 идентифицированными выше. Варианты применения активности, описанные для белков по настоящему изобретению, могут предоставляться путем введения таких белков или путем применения полинуклеотидов, кодирующих такие белки (такие как, например, полинуклеотиды в вариантах генной терапии или векторы, подходящие для введения ДНК).

35 Применение GITRL и других агонистов GITR для усиления иммунного ответа

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способам повышения пролиферации иммунных клеток, например Т-клеток (например, эффекторных Т-клеток), путем контакта иммунной клетки или популяции иммунных клеток с
 40 агонистом GITR, например полинуклеотидом или полипептидом GITRL по изобретению (например, его слитым белком) и/или агонистическим антителом против GITR, который потенцирует или усиливает активность GITR. Данные способы основаны, по меньшей мере, частично, на том открытии, что агонистическое антитело против GITR отменяет опосредованную CD4⁺CD25⁺ Т-клетками супрессию
 45 пролиферации CD4⁺CD25⁻ Т-клетками (пример 5). Способы также основаны, частично, на том открытии, что связывание с GITR, например, GITRL или агонистического антитела против GITR, индуцирует пролиферацию эффекторных Т-клеток (например, CD4⁺CD25⁻ и CD8⁺ Т-клеток) (пример 9 и пример 13). Авторы также показали, что
 50 связывание с GITR GITRL предоставляет костимуляторный сигнал эффекторным Т-клеткам (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток), с повышением, таким образом, способностей эффекторных Т-клеток с преодолением супрессии, опосредованной CD4⁺CD25⁺ регуляторными Т-клетками, и пролиферацией в ответ на анти-CD3

(примеры 11 и 13); т.е. связывание GITR, экспрессируемого на эффекторных Т-клетках, агонистами GITR (например, полипептидом GITRL, его активными фрагментами и/или агонистическим антителом против GITR) делает эффекторные Т-клетки менее чувствительными к супрессии регуляторными CD4⁺CD25⁺ Т-клетками.

Соответственно агонисты GITR, стимулирующие активность GITR в эффекторных Т-клетках, могут применяться сами по себе или в комбинации с антигеном, например, в качестве адъюванта (например, вакцинного адъюванта) для положительной регуляции иммунного ответа *in vivo*, например, для применения при лечении злокачественных опухолей или инфекционных нарушений.

В одном из вариантов осуществления агонисты GITR (например, полинуклеотиды, полипептиды GITRL, их активные фрагменты и/или слитые белки, низкомолекулярные агонисты и/или агонистические антитела против GITR) могут использоваться для лечения различных иммунодефицитов и иммунных нарушений (включая тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID)), например, при положительной регуляции роста и пролиферации Т-клеток. Данные иммунодефициты могут быть генетическими или могут быть вызваны вирусными (например, ВИЧ), а также бактериальными или грибковыми инфекциями, или могут быть результатом аутоиммунных нарушений. Более конкретно, инфекционные заболевания, вызванные вирусной, бактериальной, грибковой или другой инфекцией могут подлежать лечению с использованием белка по настоящему изобретению, и они включают инфекции ВИЧ, вирусами гепатита, герпесвирусами, микобактериями, *Leishmania* spp., малярии и различные грибковые инфекции, такие как кандидоз. Конечно, в данном отношении белок по настоящему изобретению может также использоваться, когда в основном требуется стимуляция иммунной системы, т.е. при лечении злокачественной опухоли.

Положительная регуляция антигенов антигенпредставляющих клеток (APC) (например, положительная регуляция В7.1, В7.2 и В7.3) как средство положительной регуляции иммунных реакций может также применяться при лечении. Положительная регуляция иммунных реакций может происходить в виде усиления существующего иммунного ответа или возникновения исходного иммунного ответа. Например, усиление иммунного ответа посредством стимуляции антигенпредставляющих функций дендритных клеток может использоваться в случаях вирусной инфекции. Кроме того, системные вирусные заболевания, такие как грипп, обычная простуда и энцефалит, могут ослабляться путем системного введения стимуляторных форм антигенпредставляющих молекул, например антигенов дендритных клеток.

Альтернативно, противовирусные иммунные реакции могут усиливаться у инфицированного пациента путем выделения из пациента Т-клеток, совместного стимулирования Т-клеток *ex vivo* загруженными вирусным антигеном специализированными APC (например, В-клетками, макрофагами и/или дендритными клетками) и агонистами GITR (например, полинуклеотидами, полипептидами GITRL, их активными фрагментами и/или слитыми белками, низкомолекулярными агонистами и/или агонистическими антителами против GITR). Агонисты GITR (например, полинуклеотиды, полипептиды GITRL, их активные фрагменты, и/или слитые белки, и/или агонистические антитела против GITR) могут подаваться в виде растворимого белка или экспрессироваться APC. Другим способом усиления противовирусных иммунных реакций является выделение инфицированных клеток у пациента, трансфекция их нуклеиновой кислотой, кодирующей белок GITRL по настоящему изобретению, описанный здесь, так что данные клетки экспрессируют на своей поверхности все или часть белка, и повторно вводят трансфицированные клетки

пациенту. Теперь инфицированные клетки будут способны доставлять костимуляторный сигнал эффекторным Т-клеткам *in vivo*, т.е. экспрессия белка GITRL или его активного фрагмента инфицированными клетками и связывание такого белка GITRL с GITR на инфицированных Т-клетках может делать эффекторные Т-клетки менее чувствительными к супрессии CD4⁺CD25⁺ регуляторными клетками Т-клетками.

В другом применении положительная регуляция или усиление антигенной функции APC может использоваться в индукции противоопухолевого иммунитета. Опухолевые клетки (например, саркома, меланома, лимфома, лейкоз, нейробластома и карцинома), трансфицированные нуклеиновой кислотой, кодирующей, по меньшей мере, один пептид по настоящему изобретению, могут вводиться субъекту с целью преодоления опухолево-специфичной устойчивости у субъекта. Если требуется, опухолевая клетка может трансфицироваться таким образом, чтобы она экспрессировала комбинацию пептидов. Например, опухолевые клетки, полученные от пациента, могут трансфицироваться *ex vivo* экспрессирующим вектором, направляющим экспрессию агониста GITR (например, полипептидов GITR, их активных фрагментов, и/или слитых белков, и/или агонистических антител против GITR), одним или в комбинации с пептидом, имеющим только B7.2-подобную активность, или в связи с пептидом, имеющим B7.1-подобную активность, и т.д. Трансфицированные опухолевые клетки возвращают пациенту, результатом чего является экспрессия данных пептидов на поверхности трансфицированной клетки. Альтернативно, способы генной терапии могут использоваться для направленного действия на опухолевую клетку с трансфекцией *in vivo*.

Присутствие агониста GITR (например, полипептида GITRL, его активных фрагментов и/или слитых белков, низкомолекулярного агониста и/или агонистического антитела против GITR), в комбинации с пептидом, имеющим активность антигена APC (например, B7.1, B7.2 и т.д.) на поверхности опухолевой клетки, предоставляет необходимый костимуляторный сигнал Т-клеткам для индукции опосредованного Т-клетками иммунного ответа против трансфицированных опухолевых клеток. Кроме того, опухолевые клетки, которые лишены молекул МНС класса I или МНС класса II или которые не могут повторно экспрессировать достаточное количество молекул МНС класса I или МНС класса II, могут трансфицироваться нуклеиновыми кислотами, кодирующими весь или часть (например, часть, укороченную по цитоплазматическому домену) белок α -цепь МНС класса I и белок β 2-микроглобулин или белок α -цепь МНС класса II и белок β -цепь МНС класса II (или соответствующие нуклеиновые кислоты человеческих HLA) для экспрессии за счет этого белков МНС класса I или МНС класса II (или соответствующих молекул HLA) на клеточной поверхности. Экспрессия подходящего МНС класса I или класса II в связи с агонистом GITR (например, полипептидом GITRL, его активными фрагментами и/или слитыми белками, низкомолекулярным агонистом и/или агонистическим антителом против GITR) и/или пептидом, имеющим активность антигена APC (например, B7.1, B7.2, и т.д.), индуцирует опосредованный Т-клетками иммунный ответ против трансфицированных опухолевых клеток. Необязательно ген, кодирующий антисмысловую конструкцию, которая блокирует экспрессию ассоциированного с МНС класса II белка, например, инвариантной цепи, может также совместно трансфицироваться с ДНК, кодирующей агонист GITR (например, полипептид GITRL, его активные фрагменты и/или слитые белки, низкомолекулярный агонист и/или агонистическое антитело против GITR) и/или

пептид, имеющий активность антигена APC, для обеспечения представления ассоциированных с опухолью антигенов и индукции опухолеспецифического иммунитета. Таким образом, индукции опосредованного Т-клетками иммунного ответа у субъекта-человека может быть достаточно для преодоления

опухолеспецифической толерантности у данного субъекта.

В других вариантах осуществления агонисты GITR (например, полипептид GITRL, его активные фрагменты и/или слитые белки, низкомолекулярные агонисты и/или агонистические антитела против GITR) по изобретению могут применяться в качестве вакцинных адъювантов. Адъюванты представляют собой иммуномодулирующие соединения, которые способны усиливать и/или направлять развитие и профиль иммунных реакций против различных антигенов, которые сами по себе слабоиммуногены. Цитокины и/или лимфокины могут использоваться в качестве адъювантов. Подходящий выбор адъювантов может индуцировать хорошие гуморальные или клеточные иммунные реакции, которые не будут развиваться в отсутствие адъювантов. В частности, адъюванты имеют значимые эффекты по усилению иммунного ответа на субъединичные и пептидные антигены в вакцинах. Их стимуляторная активность также является преимущественной для развития антигенспецифических иммунных реакций направленных против белковых антигенов. Для различных антигенов, которые требуют сильных реакций в слизистых, высоких титров в сыворотке, индукции CTL (цитотоксических Т-лимфоцитов) и интенсивных клеточных реакций, комбинации адъюванта и цитокина/лимфокина предоставляют стимулы, которые не предоставляются большинством антигенных препаратов.

Используемая фраза «вакцинный адъювант» или «вакциная терапия», как предполагается, означает применение агониста GITR (например, полинуклеотида GITRL, полипептида GITRL, его активного фрагмента, его слитого белка и/или агонистического антитела против GITR) в комбинации с антигеном (например, вирусным, паразитарным и бактериальным полипептидами, белками или пептидами) или другими антигенами (например, полипептидами, белками или пептидами опухолевых и раковых клеток) или полинуклеотиды, кодирующие антиген для усиления, подавления или модулирования иммунного ответа на антиген. Для целей данного определения «комбинация» означает применение в связи, одновременно (комбинированно или некомбинированно) или последовательно с антигеном.

Термин «композиция вакцинного адъюванта» относится к вакцинному адъюванту, который, кроме того, включает иммунологически приемлемые разбавители или носители приемлемым образом для получения инъектируемых жидких растворов или суспензий. Композиция вакцинного адъюванта может дополнительно включать средства, которые дополнительно усиливают иммунный ответ, вызванный агонистом GITR. Например, композиция вакцинного адъюванта может, кроме того, включать 3-О-деацетилованный монофосфорилипид А (MPL®; Corixa Corporation, Сизл, Вашингтон) или монофосфорилипид А и его производные и аналоги. MPL может использоваться в интервале 1-100 мкг/доза.

Антигены, используемые для вакцинной терапии, включают белки, пептиды или полипептиды, полученные из иммуногенных и неиммуногенных белков, а также любое из следующего: сахара, белки, полинуклеотиды, или олигонуклеотиды, или другие макромолекулярные компоненты, или их фрагменты. При использовании в данном разделе «пептид» включает ряд, по меньшей мере, из шести аминокислот и содержит, по меньшей мере, одну антигенную детерминанту, в то время как «полипептид» является более длинной молекулой, чем пептид, но не составляет

полноразмерный белок. Используемый здесь термин «фрагмент» включает часть, но меньшую, чем вся молекула, сахара, белка, полинуклеотидов или олигонуклеотидов, или других макромолекулярных компонентов.

Используемый здесь термин «эффективное количество адъюванта» означает дозу комбинации описанных адъювантов, которая подходит для достижения повышенного иммунного ответа у хозяина-позвоночного. Конкретная дозировка зависит от возраста, массы и медицинского состояния хозяина, а также от способа введения антигена.

Композиция вакцинного адъюванта по изобретению может вводиться относящемуся к человеку или не относящемуся к человеку позвоночному различными путями, включая, но без ограничения, интраназальный, пероральный, вагинальный, ректальный, парентеральный, внутрикожный, чрескожный (см., например, Международную публикацию WO 98/20734, которая включена в данное описание в качестве ссылки), внутримышечный, внутрибрюшинный, подкожный, внутривенный и внутриартериальный. Количество антигенного компонента или компонентов антигенной композиции изменяется частично в зависимости от природы антигена, а также от возраста, массы и медицинского состояния субъекта, а также от способа введения. Подходящие дозы легко определяют специалисты в данной области. Предпочтительно, но не обязательно, чтобы антиген и комбинация адъювантов вводились в одно и то же время. Число доз и режимов дозирования для антигенной композиции также легко определяют специалисты в данной области. В некоторых случаях адъювантные свойства комбинации адъювантов могут снизить число необходимых доз или временной ход режима дозирования.

Комбинации адъювантов по настоящему изобретению подходят для применения в комбинации с разнообразными антигенами из различных патогенных микроорганизмов, включая, но без ограничения, антиген из вирусов, бактерий, грибков или паразитарных микроорганизмов, которые инфицируют людей и не относящихся к человеку позвоночных, или из раковой клетки или опухолевой клетки (например, саркомы, меланомы, лимфомы, лейкоза, нейробластомы и карциномы). Антиген может включать в себя пептиды или полипептиды, полученные из белков, а также фрагменты любого из следующего: сахара, белка, полинуклеотиды или олигонуклеотиды, раковые или опухолевые клетки или другие макромолекулярные компоненты. В некоторых случаях в антигенную композицию входит более одного антигена.

Требуемые вирусные вакцины, содержащие адъювантные комбинации по данному изобретению, включают вакцины, направленные на профилактику и/или лечение заболевания, вызванного, без ограничений, вирусом иммунодефицита человека, вирусом иммунодефицита обезьян, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом парагриппа типов 1-3, вирусом гриппа, вирусом простого герпеса, цитомегаловирусом человека, вирусом гепатита А, вирусом гепатита В, вирусом гепатита С, человеческим папилломавирусом, вирусом полиомиелита, ротавирусом, калицивирусами, вирусом кори, вирусом свинки, вирусом краснухи, аденовирусом, вирусом бешенства, вирусом собачьей чумы, вирусом чумы крупного рогатого скота, коронавирусом, парвовирусом, вирусом инфекционного ринотрахеита, вирусом кошачьего лейкоза, вирусом кошачьего инфекционного перитонита, вирусом инфекционной болезни фабрики сумки птиц, вирусом болезни Ньюкасла, вирусом болезни Марека, вирусом респираторного и репродуктивного синдрома свиней, вирусом артериита лошадей и различными вирусами энцефалита.

Требуемые бактериальные вакцины, содержащие адъювантные комбинации по данному изобретению включают вакцины, направленные на профилактику и/или лечение заболевания, вызванного, без ограничений, *Haemophilus influenzae* (типизируемой и нетипизируемой), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*,
 5 *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*,
 10 *Mycobacterium tuberculosis*, комплексом *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Mycoplasma gallisepticum*.

Требуемые грибковые вакцины, содержащие адъювантные комбинации по данному изобретению, включают вакцины, направленные на профилактику и/или лечение заболевания, вызванного, без ограничений, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* и *Histoplasma*.

Требуемые вакцины против паразитов, содержащие адъювантные комбинации по данному изобретению, включают вакцины, направленные на профилактику и/или лечение заболевания, вызванного, без ограничений, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* и *Pneumocystis carinii*.

Требуемые вакцины для индукции терапевтического или профилактического противоопухолевого эффекта в хозяине-позвоночном, которые содержат комбинации адъювантов по данному изобретению, включают вакцины, использующие раковый антиген или опухолессоциированный антиген, включая, без ограничений, простатоспецифичный антиген (PSA), простатоспецифичный мембранный антиген (PSMA), раковый эмбриональный антиген (CEA), MUC-1, Her2, CA-125, MAGE-3, EGFR, HELP, GCC, CD66-с, простагин, TMPRSS3, TADG 12 и TADG 15.

В случае HIV и SIV антигенные композиции включают в себя, по меньшей мере, один белок, полипептид, пептид или фрагмент, происходящий из указанного вируса. В некоторых случаях в антигенную композицию включены многие белки HIV или SIV, полипептиды, пептиды и/или их фрагменты.

Препараты комбинации адъювантов по данному изобретению также подходят для включения в качестве адъюванта в полинуклеотидные вакцины (также известные как ДНК-вакцины). Такие вакцины могут далее включать способствующие средства, такие как бупивикаин (см. патент США № 5593972, включенный в данное описание в качестве ссылки).

Способы 1) стимуляции функций антигенпредставляющей клетки, например, функций дендритной клетки; 2) выделения Т-клеток из пациента, совместной стимуляции их *ex vivo* и введения обратно субъекту; 3) трансфекции опухолевых клеток для индукции противоопухолевого иммунитета и 4) применения вакцинных адъювантов, хорошо известны в данной области (см., например, Cerundolo et al. (2004) Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. Nat. Immunol. 5(1):7-10; Ko et al. (2003) Immunotherapy of malignant diseases. Int. Arch. Allergy Immunol. 132:294-309; Valmori et al. (1999) An antigen-targeted approach to adoptive transfer therapy of cancer. Cancer Res. 59:2167-73).

Применение антагонистов G1TR для снижения активности иммунных клеток

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу поддержания

чувствительности эффекторных Т-клеток, например CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток или их популяции, к супрессии CD4⁺ CD25⁺ регуляторными Т-клетками. Способ может включать контакт популяции Т-клеток с антагонистом GITR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярный антагонист, 5 нейтрализующее антитело против GITR и/или нейтрализующее антитело против GITRL) в количестве, достаточном для ингибирования активности иммунной клетки или популяции. Антагонисты GITR могут также вводиться субъектам, у которых требуется иммунный ответ. Данные условия включают в себя, например, аутоиммунные нарушения (например, артритные нарушения), воспалительные заболевания или трансплантацию органов.

Данные способы основаны, по меньшей мере, частично на открытии, что снижение активности GITR, например, с использованием нейтрализующего антитела 15 против GITRL восстанавливает опосредованную CD4⁺CD25⁺ супрессию (пример 13), т.е. нейтрализующее антитело против GITRL поддерживает чувствительность эффекторных Т-клеток, например CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, к супрессии CD4⁺CD25⁺ регуляторными Т-клетками. Кроме того, авторы продемонстрировали, что инкубация эффекторных Т-клеток нейтрализующим антителом против GITRL ослабляет 20 заболевание при мышинном экспериментальном аутоиммунном энцефалите (ЕАЕ) (пример 14). В соответствии с этим антагонисты GITR, т.е. молекулы, которые ингибируют активность GITR (например, антитела против GITRL), могут использоваться для поддержания чувствительности эффекторных Т-клеток к 25 супрессии CD4⁺CD25⁺ Т-клетками *in vivo*, например, для лечения или профилактики ассоциированных с иммунными клетками патологий, включающих отторжение трансплантата, воспалительные заболевания и аутоиммунные нарушения.

Также могут использоваться способы применения антагонистов GITR, ингибирующих активность (например, пролиферацию, дифференцировку, выживание) 30 эффекторной Т-клетки, и, таким образом, могут использоваться для лечения или профилактики различных иммунных нарушений. Не ограничивающие примеры нарушений, которые могут подлежать лечению или профилактике, включают, но без ограничения, отторжение трансплантата, аутоиммунные заболевания (включая, 35 например, сахарный диабет, артрит (включая ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), рассеянный склероз, энцефаломиелит, бульбоспинальный паралич, системную красную волчанку, аутоиммунный тиреоидит, дерматит (включая атопический дерматит и экзематозный дерматит), псориаз, синдром Шегрена, болезнь Крона, афтозную язву, воспаление 40 радужки глаза, конъюнктивит, кератоконъюнктивит, язвенный колит, спондилоартропатию, анкилозирующий спондилит, инфекционно-аллергическую астму, аллергическую астму, кожную красную волчанку, склеродермию, вагинит, проктит, медикаментозный дерматит, лепрозные возвратные реакции, лепрозную 45 узловую эритему, аутоиммунный увеит, аллергический энцефаломиелит, острую некротизирующую геморрагическую энцефалопатию, идиопатическую билатеральную нейросенсорную потерю слуха, апластическую анемию, истинную эритроцитарную аплазию, идиопатическую тромбоцитопению, полихондрит, гранулематоз Вегенера, хронический активный гепатит, синдром Стивенса-Джонсона, идиопатические афты, 50 плоский лишай, болезнь Грейвса, саркоидоз, первичный билиарный цирроз, задний увеит и интерстициальный фиброз легкого), болезнь трансплантат против хозяина и аллергию, такую как атопическая аллергия. Предпочтительные нарушения, которые можно лечить с использованием способов, включающих введение антагонистов GITR,

например, нейтрализующего GITRL антитела, включают артритные нарушения (например, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит и анкилозирующий спондилит (предпочтительно, ревматоидный артрит)), рассеянный склероз, диабет I типа, волчанку (СКВ), IBD,

В другом варианте осуществления антагонисты G1TR, отдельно или в комбинации с другими описываемыми терапевтическими средствами (например, агонистами TNF), могут использоваться для лечения множественной миеломы и связанных В-лимфоцитарных злокачественных опухолей (Brenne, A. et al. (2002) Blood 99 (10):3756-62).

С использованием антагонистов G1TR (например, ингибиторных полинуклеотидов GITRL, низкомолекулярных антагонистов и/или нейтрализующих антител к G1TR и/или GITRL) возможно модулировать иммунные реакции некоторыми путями. Отрицательная регуляция может происходить в виде ингибирования или блокирования иммунного ответа, уже прогрессирующего, или может участвовать в профилактике индукции иммунного ответа. Функции активированных Т-клеток могут ингибироваться путем усиления супрессии Т-клеточных реакций, или путем индукции специфичной толерантности в Т-клетках, или по обоим механизмам.

Иммуносупрессия Т-клеточных реакций, в основном, представляет собой активный, неспецифичный в отношении антигена процесс, который требует продолжительного воздействия на Т-клетки супрессирующего средства. Толерантность, в которой участвует отсутствие реактивности или анергия Т-клеток, отличается от иммуносупрессии тем, что она, в основном, является антигенспецифичной и сохраняется после прекращения воздействия вызывающего толерантность агента. Практически толерантность может демонстрироваться отсутствием Т-клеточного ответа после повторного воздействия специфичного антигена в отсутствие вызывающего толерантность средства.

Отрицательная регуляция или предотвращение одной или нескольких функций антигена антигенпредставляющей клетки (например, В7.1) и, таким образом, предотвращение высокого уровня синтеза лимфокинов активированными Т-клетками может использоваться в ситуациях трансплантации ткани, кожи или органа и при болезни трансплантат против хозяина (GVHD). Например, блокада функции Т-клеток должна приводить к снижению деструкции ткани в тканевых трансплантатах. Обычно в трансплантатах ткани отторжение трансплантата инициируется посредством его распознавания как чужеродного Т-клетками с последующей иммунной реакцией, которая разрушает трансплантат. Введение антагониста G1TR (например, ингибиторных полинуклеотидов GITRL, низкомолекулярного антагониста, нейтрализующего антитела против G1TR и/или нейтрализующего антитела против GITRL) в комбинации с молекулой, которая ингибирует или блокирует взаимодействие лимфоцитарного антигена В7 с его природным(и) лигандом(ами) на иммунных клетках (например, с растворимой мономерной формой пептида, имеющего активность В7.2, отдельно или в связи с мономерной формой пептида, имеющего активность другого В-лимфоцитарного антигена (например, В7.1), или с блокирующим антителом) перед трансплантацией, может приводить к связыванию данной молекулы с природным(и) лигандом(ами) на иммунных клетках без передачи соответствующего костимуляторного сигнала. Блокирование функции лимфоцитарного антигена В7 таким способом предотвращает синтез иммунными клетками, например эффекторными Т-клетками, цитокинов и, таким образом,

действует в качестве иммунодепрессанта. Более того, отсутствие костимуляции может также быть достаточным для придания Т-клеткам энергии, с индукцией за счет этого у субъекта толерантности. Индукция долгосрочной толерантности реагентами, блокирующими лимфоцитарный антиген В7, может отменить необходимость повторного введения данных блокирующих реагентов. Для достижения у субъекта достаточной иммуносупрессии или толерантности также может быть необходимым блокировать функцию комбинации В-лимфоцитарных антигенов.

Эффективность конкретных блокирующих реагентов при профилактике отторжения органного трансплантата или GVHD может оцениваться с использованием экспериментальных животных, что предсказывает их эффективность на людях. Примеры подходящих систем, которые могут использоваться, включают аллогенные трансплантаты сердца у крыс и ксеногенные трансплантаты островков поджелудочной железы у мышей, причем оба они применяются для оценки иммуносупрессорных эффектов слитых белков CTLA4Ig *in vivo*, как описано Lenschow et al. (1992) в Science 257:789-92 и Turka et al. (1992) в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11102-05. Кроме того, мышинные модели GVHD (см., например, Paul, ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp.846-47) могут использоваться для определения эффекта блокирования функции В-лимфоцитарных антигенов *in vivo* на развитие данного заболевания.

Блокирование функции антигена APC может быть также терапевтически полезным при лечении аутоиммунных заболеваний. Многие аутоиммунные нарушения являются результатом несоответствующей активации Т-клеток, которые способны взаимодействовать с собственной тканью и способствуют продукции цитокинов и аутоантител, вовлеченных в патологию заболеваний. Предотвращение активации аутореактивных Т-клеток может снижать или отменять симптомы заболевания. Введение антагонистов GITR (например, ингибиторных полинуклеотидов GITRL, низкомолекулярных антагонистов и/или нейтрализующих антител против GITR и/или GITRL) в комбинации с реагентами, которые блокируют костимуляцию Т-клеток, разрушая взаимодействия лиганд-рецептор антигенов APC, может использоваться для ингибирования активации и предотвращения продукции аутоантител или полученных из Т-клеток цитокинов, которые могут быть вовлечены в процесс заболевания. Кроме того, антагонисты GITR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL) в комбинации с блокирующими реагентами могут индуцировать антигенспецифическую толерантность аутореактивных Т-клеток, что может приводить к долгосрочной ремиссии заболевания. Эффективность данных средств для предотвращения или ослабления аутоиммунных нарушений может определяться с использованием некоторого количества хорошо охарактеризованных моделей аутоиммунных заболеваний человека на экспериментальных животных. Примеры включают мышинный экспериментальный аутоиммунный энцефалит (EAE), системную красную волчанку у мышей MRL/lpr/lpr или у гибридных мышей NZB, мышинный аутоиммунный коллагеновый артрит, сахарный диабет у мышей NOD и крыс BB и мышинный экспериментальный бульбоспинальный паралич (см., например, Paul, ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp.840-56).

В одном из вариантов осуществления антагонисты GITR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL), включая их фармацевтические композиции, вводят в комбинированной терапии, т.е. комбинированными с другими средствами,

например терапевтическими средствами, которые могут использоваться для лечения патологических состояний и нарушений, таких как иммунные нарушения и воспалительные заболевания. Термин «в комбинации» в данном контексте означает,

что данные средства вводят, по существу, в одно время, вместе или последовательно. При последовательном введении в начале введения второго соединения первое из двух соединений предпочтительно еще выявляется в эффективных концентрациях в участке обработки.

Например, комбинированное лечение может включать в себя один или несколько антагонистов GITR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL), составленный в один препарат и/или введенные с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например одним или несколькими цитокинами и ингибиторами фактора роста, иммунодепрессантами, противовоспалительными средствами, метаболическими ингибиторами, ингибиторами ферментов и/или цитотоксическими или цитостатическими средствами, как более подробно описано ниже. Более того, один или несколько антагонистов GITR (например, ингибиторных полинуклеотидов против GITRL, низкомолекулярных антагонистов и/или нейтрализующих антител против GITR и/или GITRL), описанных здесь, могут использоваться в комбинации с двумя или более описанными терапевтическими средствами. Такие комбинированные варианты лечения могут предпочтительно использовать более низкие дозировки вводимых терапевтических средств, таким образом, избегая предпочтительных вариантов токсичности или осложнений, ассоциированных с различными видами монотерапии. Более того, описанные здесь терапевтические средства действуют на пути, которые отличаются от пути рецептора GITRL, и, таким образом, усиливают и/или обладают синергией в отношении эффектов антагонистов GITR, т.е. в данной случае эффекторные Т-клетки сохраняют свою чувствительность к супрессии $CD4^+CD25^+$ регуляторными Т-клетками.

Предпочтительные терапевтические средства, используемые в комбинации с антагонистом GITRL, представляют собой такие средства, которые препятствуют аутоиммунному и последующему воспалительному ответу на разных стадиях. В одном из вариантов осуществления один или несколько из антагонистов GITR (например, ингибиторных полинуклеотидов GITRL, низкомолекулярных антагонистов и/или нейтрализующих антител против GITR и/или GITRL), описанных здесь, может состояться в общий препарат и/или вводиться с одним или несколькими дополнительными средствами, например с другими антагонистами цитокинов или факторов роста (например, растворимыми рецепторами, пептидными ингибиторами, малыми молекулами, слитыми белками с лигандами); или с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, которые связываются с другими мишенями (например, антителами, которые связываются с другими цитокинами или факторами роста, их рецепторами или другими молекулами клеточной поверхности); и противовоспалительными цитокинами или их агонистами. Не ограничивающие примеры средств, которые могут связываться в комбинации с антагонистами GITR (например, ингибиторными полинуклеотидами против GITRL, низкомолекулярными антагонистами и/или нейтрализующими антителами против GITR и/или GITRL), описанными здесь, включают, но без ограничения, антагонисты одного или нескольких интерлейкинов (IL) или их рецепторов, например антагонисты IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18 и IL-22; антагонисты цитокинов или факторов роста или их рецепторов, таких как фактор некроза опухоли (TNF),

LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антагонисты GITR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL) могут также сравниваться, например, с антителами-ингибиторами поверхностных молекул, например, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90 или их лигандов, включая CD154 (gp39 или CD40L), или LFA-1/ICAM-1 и VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al. (2002) Med. Res. Rev. 22:146-67). Предпочтительные антагонисты, которые могут использоваться в комбинации с антагонистами GITR (например, ингибиторными полинуклеотидами GITRL, низкомолекулярными антагонистами и/или нейтрализующими антителами против GITR и/или GITRL), описанными здесь, включают в себя антагонисты IL-1, IL-12, TNF α , IL-15, IL-17, IL-18 и IL-22.

Примеры таких средств включают в себя антагонисты IL-12, такие как химерные, гуманизированные, человеческие или генерированные *in vitro* антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются с IL-12 (предпочтительно человеческим IL-12), например антитело, описанное в WO 00/56772; ингибиторы рецептора IL-12, например антитела против человеческого рецептора IL-12; и растворимые фрагменты рецептора IL-12, например человеческого рецептора IL-12. Примеры антагонистов IL-15 включают антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) против IL-15 или его рецептора, например химерные, гуманизированные, человеческие или генерированные *in vitro* антитела против человеческого IL-15 или его рецептора, растворимые фрагменты рецептора IL-15 и IL-15-связывающие белки. Примеры антагонистов IL-18 включают антитела, например химерные, гуманизированные, человеческие или генерированные *in vitro* антитела против человеческого IL-18 или его рецептора (или их антигенсвязывающие фрагменты), растворимые фрагменты рецептора IL-18 и IL-18-связывающие белки (IL-18BP, Mallet et al. (2001) Circ. Res. 28). Примеры антагонистов IL-1 включают ингибиторы интерлейкин-1-превращающего фермента (ICE), такие как Vx740, антагонисты IL-1, например, IL-1RA (Anikinra, Amgen), sIL1RII (Immunex), и антитела против рецептора IL-1 (или их антигенсвязывающие фрагменты).

Примеры антагонистов TNF включают антитела, например химерные, гуманизированные, человеческие или генерированные *in vitro* антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) против TNF (например, человеческого TNF α), например, D2E7 (человеческое антитело против TNF α , патент США № 6258562), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (гуманизированное антитело против TNF α ; Celltech/Pharmacia), cA2 (химерное антитело против TNF α ; RemicadeTM, Centocor); фрагменты антитела против TNF (например, CPD870); растворимые фрагменты рецепторов TNF, например, человеческие рецепторы TNF p55 или p75 или их производные, например, 75 кД TNFR-IgG (слитый белок 75 кД рецептор TNF-IgG, EnbrelTM; Immunex; см., например, Arthritis & Rheumatism (1994) 37:S295; J. Invest. Med. (1996) 44:235A), p55 кД TNFR-IgG (слитый белок 75 кД рецептор TNF-IgG (Lenercept)); антагонисты ферментов, например, ингибиторы TNF α -превращающего фермента (TACE) (например, производное альфа-сульфонилгидроксамовой кислоты, WO 01/55112, и N-гидроксиформаимидный ингибитор TACE GW 3333, -005 или -022); и TNF-bp/s-TNFR (растворимый TNF-связывающий белок; см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) 39 (9) (приложение): S284; Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology (1995) 268:37-42). Предпочтительными антагонистами TNF являются растворимые фрагменты рецепторов TNF, например

человеческие рецепторы TNF p55 или p75, например 75 кД TNFR-IgG, и ингибиторы TNF α -превращающего фермента (TACE).

В других вариантах осуществления описываемые антагонисты GITR могут вводиться в комбинации с одним или несколькими из следующих компонентов:

5 антагонистами IL-13, например растворимые рецепторы IL-13 (sIL-13) и/или антитела против IL-13; антагонистами IL-2, например DAB 486-IL-2 и/или DAB 389-IL-2 (слитые белки IL-2; Seragen; см., например Arthritis & Rheumatism (1993) 36:1223), и/или антитела против IL-2R, например анти-Tac (гуманизированное антитело против IL-2R; Protein

10 Design Labs, Cancer Res. (1990) 50 (5):1495-502). Еще одна комбинация включает антагонисты GITR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL) в комбинации с неистошающими ингибиторами CD4 (IDEC-CE9.1/SB 210396; неистошающее приматизированное антитело против CD4; IDEC/SmithKline).

15 Другие предпочтительные комбинации включают в себя антагонисты костимуляторного пути CD80 (B7.1) или CD86 (B7.2), включая антитела, растворимые рецепторы или антагонистические лиганды; а также гликопротеиновый лиганд р-селектина (PSGL), противовоспалительные цитокины, например IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; рекомбинантный IL-10 DNAX/Schering); IL-13 и TGF- β , и их агонисты (например, агонистические антитела).

В других вариантах осуществления один или несколько антагонистов GITR могут составляться в препарат и/или совместно вводиться с одним или несколькими

25 противовоспалительными лекарственными средствами, иммунодепрессантами или метаболическими ингибиторами или ингибиторами ферментов. Не ограничивающие примеры лекарственных средств или ингибиторов, которые могут использоваться в комбинации с антагонистами GITR (например, ингибиторными полинуклеотидами GITRL, низкомолекулярными антагонистами и/или

30 нейтрализующими антителами против GITR и/или GITRL), описанными здесь, включают одно или несколько следующих средств: нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), например ибупрофен, тенидап (см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) 39 (9) (supplement): S280)), напроксен (см., например, Neuro. Report (1996) 7:1209-13), мелоксикам, пироксикам,

35 диклофенак и индометацин; сульфазалазин (см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) 39 (9) (supplement): S281); кортикостероиды, такие как преднизолон; противовоспалительные средства-супрессоры цитокинов (CSAID); ингибиторы биосинтеза нуклеотидов, например ингибиторы биосинтеза пуринов, антагонисты

40 фолиевой кислоты (например, метотрексат (N-[4-[(2,4-диамино-6-птеридинил)метил]метиламино]бензоил]-L-глутаминовая кислота); и ингибиторы биосинтеза пиримидина, например ингибиторы дигидрооротатдегидрогеназы DHODH (например, лефлуномид (см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S131; Inflammation Research (1996) 45:103-

45 07). Предпочтительные терапевтические средства для применения в комбинации с антагонистами GITR (например, ингибиторными полинуклеотидами GITRL, низкомолекулярными антагонистами и/или нейтрализующими антителами против GITR и/или GITRL) включают NSAID, CSAID, ингибиторы (DHODH) (например, лефлуномид) и ингибиторы фолиевой кислоты (например, метотрексат).

50 Примеры дополнительных ингибиторов включают одно или несколько следующих средств: кортикостероиды (пероральные, ингалируемые и для местной инъекции); иммунодепрессанты, например циклоспорин, такролимус (FK-506); и

ингибиторы mTOR, например сиролимус (рапамицин) или производные рапамицина, например растворимые производные рапамицина (например, сложноэфирные производные рапамицина, например CCI-779 (Elit (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3 (8):1249-53; Huang et al. (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3 (2):295-304); средства, препятствующие передаче сигнала провоспалительными цитокинами, такими как TNF α или IL-1 (например, IRAK, NIK, IKK, p38 или ингибиторы MAP-киназы); ингибиторы COX2, например целекоксиб, рофекоксиб и их варианты, см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S81); ингибиторы фосфодиэстеразы, например R973401 (ингибитор фосфодиэстеразы типа IV; см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S282)); ингибиторы фосфолипазы, например ингибиторы цитозольной фосфолипазы 2 (сPLA2) (например, аналоги трифторметилкетона (патент США № 6350892)); ингибиторы фактора роста сосудистого эндотелия или рецептора фактора роста, например ингибитор VEGF и/или ингибитор VEGF-R; и ингибиторы ангиогенеза. Предпочтительными терапевтическими средствами для применения в комбинации с антагонистами G1TR (например, ингибиторными полинуклеотидами G1TRL, низкомолекулярными антагонистами и/или нейтрализующими антителами против G1TR и/или G1TRL) являются иммуносупрессоры, например циклоспорин, такролимус (FK-506); ингибиторы mTOR, например сиролимус (рапамицин) или производные рапамицина, например растворимые производные рапамицина (например, сложноэфирные производные рапамицина, например CCI-779); ингибиторы COX2, например целекоксиб и его варианты; и ингибиторы фосфолипазы, например ингибиторы цитозольной фосфолипазы 2 (сPLA2), например аналоги трифторметилкетона.

Дополнительные примеры терапевтических средств, которые могут комбинироваться с антагонистом G1TRL, включают в себя одно или несколько из следующих средств: 6-меркаптопурины (6-MP); азатиопринсульфалазин; мезалазин; олсалазин; хлорохин/гидроксихлорохин; пенцилламин; ауротиомалат (внутримышечный и пероральный); азатиоприн; кохицин; агонисты бета-2-адренорецепторов (салбутамол, тербуталин, салметерал); ксантины (теофиллин, аминофиллин); кромогликат; недокромил; кетотифен; ипратропиум и окситропиум; микофенолат мофетил; агонисты аденозина; противотромбозные средства; ингибиторы комплемента; и адренергические средства.

Применение описанных здесь агонистов G1TR в комбинации с другими терапевтическими средствами для лечения или профилактики конкретных иммунных нарушений более подробно описано ниже.

Не ограничивающие примеры или средства для лечения или профилактики артритных нарушений (например, ревматоидного артрита, воспалительного артрита, ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, остеоартрита и псориатического артрита), с которыми могут комбинироваться антагонисты G1TR, включают одно или несколько из следующих средств: описанные выше антагонисты IL-12, NSAID; CSAID; антагонисты TNF, например, TNF α , описанные выше; описанные выше неистощающие антитела против CD4; описанные выше антагонисты IL-2; противовоспалительные цитокины, например, IL-4, IL-10, IL-13 и TGF α или их агонисты; описанные выше антагонисты IL-1 или рецептора IL-1; описанные выше ингибиторы фосфодиэстеразы; описанные выше ингибиторы COX-2; илопрост (см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S82); метотрексат; талидомид (см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S282) и родственные талидомиду лекарственные средства

(например, Celgen); лефлуномид; ингибитор активации плазминогена, например транексамовая кислота; см., например, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S284); ингибитор цитокинов, например T-614; см., например, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S282); простагландин E1 (см.,
 5 например, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S282); азатиоприн (см., например, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S281); ингибитор интерлейкин-1-превращающего фермента (ICE); ингибитор zap-70 и/или lck (ингибитор тирозиновой киназы zap-70 или lck); описанный выше ингибитор фактора роста
 10 эндотелия сосудов или рецептора фактора роста эндотелия сосудов; кортикостероидные противовоспалительные лекарственные средства (например, SB203580); ингибиторы TNF-конвертазы; IL-11 (см., например, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S296); IL-13 (см., например, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S308); ингибиторы IL-17 (см.,
 15 например, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, № 9 (supplement), S120); золото; пеницилламин; хлорохин; гидроксихлорохин; хлорамбуцил; циклофосфамид; циклоспорин; общее облучение лимфоидной ткани; антитимоцитарный глобулин; CD5-токсины; перорально вводимые пептиды и коллаген; династрия лобезарит;
 20 регулирующие цитокины средства (CRA) HP228 и HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); антисмысловые фосфотиоатные олигонуклеотиды ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); растворимый рецептор комплемента 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); преднизон; орготеин; гликозамингликана полисульфат; миноциклин; антитела против IL2R; морские и растительные липиды (жирные кислоты из рыбы и семян
 25 растений; см., например, DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-77); ауранофин; фенилбутазон; меклофенамовая кислота; флуфенамовая кислота; внутривенный иммуноглобулин; зилейтон; микофеноловая кислота (RS-61443); такролимус (FK-506); сиролимус (рапамицин); амиприлоз (терафектин); кладрибин (2-хлордезоксиаденозин); андазарибин. Предпочтительные комбинации включают
 30 один или несколько антагонистов G1TR (например, ингибиторные полинуклеотиды G1TRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против G1TR и/или G1TRL) в комбинации с метотрексатом или лефлуномидом, и, в случаях умеренного или тяжелого ревматоидного артрита,
 35 циклоспорин.

Предпочтительные примеры ингибиторов для применения в комбинации с антагонистами G1TR для лечения артритных нарушений включают антагонисты TNF (например, химерные, гуманизированные, человеческие или генерированные *in vitro*
 40 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TNF; растворимые фрагменты рецептора TNF, например человеческого рецептора TNF p55 или p75 или их производные, например 75 кД TNFR-IgG (слитый белок 75 кД рецептор TNF-IgG, Enbrel™), слитый белок p55 кД рецептор TNF-IgG; антагонисты ферментов TNF, например, ингибиторы TNFα-превращающего фермента (TACE));
 45 антагонисты IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22; истощающие Т-клетки и В-клетки средства (например, антитела против CD4 или против CD22); низкомолекулярные ингибиторы, например метотрексат и лефлуномид; сиролимус (рапамицин) и их аналоги, например CCI-779; ингибиторы соx-2 и cPLA2; NSAID; ингибиторы p38,
 50 ингибиторы TPL-2, Mk-2 и NFκb; RAGE или растворимый RAGE; Р-селектин или ингибиторы PSGL-1 (например, низкомолекулярные ингибиторы, антитела против него, например антитела против Р-селектина); агонисты рецептора эстрогена бета (ERB) или антагонисты ERB-NFκb. Наиболее предпочтительные дополнительные

терапевтические средства, которые могут вводиться совместно и/или входить в один препарат с одним или несколькими антагонистами GITR (например, ингибиторными полинуклеотидами GITRL, низкомолекулярными антагонистами и/или

нейтрализующими антителами против GITR и/или GITRL), включают одно или

5 несколько следующих средств: растворимый фрагмент рецептора TNF, например человеческого рецептора TNF p55 или p75 или его производного, например 75 кД TNFR-IgG (слитый белок 75 кД рецептор TNF-IgG, Enbrel™); метотрексат, лефлуномид или сиролimus (рапамицин) и его аналоги, например CCI-779.

10 Не ограничивающие примеры средств для лечения или профилактики рассеянного склероза, с которыми может комбинироваться антагонисты GITR, включают следующее: интерфероны, например интерферон-альфа-1a (например, Avonex™; Biogen) и интерферон-1b (Betaseron™; Chiron/Berlex); сополимер 1 (Cop-1; копаксон; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); гипербарический кислород; внутривенный

15 иммуноглобулин; кладрибин; антагонисты TNF, описанные выше; кортикостероиды; преднизолон; метилпреднизолон; азатиоприн; циклофосфамид; циклоспорин; метотрексат; 4-аминопиридин и тизанидин. Дополнительные антагонисты, которые могут быть использованы в комбинации с антагонистами GITR (например,

20 ингибиторными полинуклеотидами GITRL, низкомолекулярными антагонистами и/или нейтрализующими антителами против GITR и/или GITRL), включают в себя антитела или антагонисты человеческих цитокинов или факторов роста, например TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF и PDGF. Описанные выше антагонисты GITR (например, ингибиторные

25 полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL) могут комбинироваться с антителами против других молекул клеточной поверхности, например CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 или их лигандов. Антагонисты GITR

30 (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL) могут также комбинироваться с такими средствами, как метотрексат, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолат мофетил, лефлуномид, NSAID, например ибупрофен, кортикостероиды, например преднизолон, ингибиторы фосфолиэстеразы, агонисты

35 аденозина, противотромбозные средства, ингибиторы комплемента, адренергические средства, средства, которые препятствуют передаче сигнала провоспалительных цитокинов, ингибиторы IL-1b-превращающего фермента (например, Vx740), анти-P7s, PSGL, ингибиторы TACE, ингибиторы передачи сигнала Т-клеток, такие как

40 ингибиторы киназ, ингибиторы металлопротеиназ, сульфалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, описанные выше растворимые рецепторы цитокинов и их производные и противовоспалительные цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-13 и TGF).

Предпочтительные примеры терапевтических средств для лечения рассеянного

45 склероза, с которыми могут комбинироваться антагонисты GITR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярные антагонисты и/или нейтрализующие антитела против GITR и/или GITRL), включают интерферон-b, например IFNb-1a и IFNb-1b; копаксон, кортикостероиды, ингибиторы IL-1, ингибиторы TNF, антитела против лиганда CD40 и CD80 и антагонисты IL-12.

50 Не ограничивающие примеры средств для лечения или профилактики воспалительного заболевания кишечника (например, болезнь Крона, язвенный колит), с которыми может комбинироваться антагонист GITR (например, ингибиторные

полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярный антагонист и/или нейтрализующее антитело против G1TR и/или GITRL), включают следующее: буденозид; эпидермальный фактор роста; кортикостероиды; циклоспорин, сульфасалазин; аминосалицилаты; 6-меркаптопурин; азатиоприн; метронидазол; ингибиторы

 5 липоксигеназы; мезаламин; олсалазин; балсалазид; антиоксиданты; ингибиторы тромбосана; антагонисты рецептора IL-1; моноклональные антитела против IL-1; моноклональные антитела против IL-6; факторы роста; ингибиторы эластазы; соединения пиридинилимидазола; антагонисты TNF, описанные выше; цитокины

 10 IL-4, IL-10, IL-13 и/или TGF β или их агонисты (например, антитела-агонисты); IL-11; конъюгированные с глюкуронидом или декстраном пролекарства преднизолона, дексаметазона или будезонида; антисмысловые фосфотиоатные олигонуклеотиды ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); растворимый рецептор комплемента 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); мезалазин замедленного

 15 высвобождения; метотрексат; антагонисты фактора активации тромбоцитов (PAF); ципрофлоксацин и лигнокаин.

В одном из вариантов осуществления антагонист G1TR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярный антагонист и/или нейтрализующее

 20 антитело против G1TR, и/или нейтрализующее антитело против GITRL) может использоваться в сочетании с одним или несколькими антителами, направленными на другие мишени, задействованные в регуляции иммунных реакций, например, отторжение трансплантата или болезнь трансплантат против хозяина. Не ограничивающие примеры средств для лечения или профилактики иммунных реакций,

 25 с которыми может комбинироваться антагонист G1TR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярный антагонист, нейтрализующее антитело против G1TR и/или нейтрализующее антитело против GITRL) по изобретению, включают следующее: антитела против других молекул клеточной поверхности,

 30 включая, но без ограничения, CD25 (рецептор интерлейкина-2а), CD11а (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7.1) и/или CD86 (B7.2). В еще одном осуществлении антагонист G1TR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярный антагонист, нейтрализующее антитело против G1TR и/или

 35 нейтрализующее антитело против GITRL) применяют в комбинации с одним или несколькими общими иммунодепрессантами, например циклоспорином А или FK506.

В других вариантах осуществления антагонисты G1TR (например, ингибиторные полинуклеотиды GITRL, низкомолекулярный антагонист и/или нейтрализующее антитело против GITRL) применяют в качестве вакцинных адъювантов против

 40 аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний или отторжения трансплантата. Комбинации адъювантов для лечения данных типов нарушений подходят для применения в сочетании с разнообразными антигенами из аутоантигенов-мишеней, например аутоантигенов, участвующих в аутоиммунитете, например, из основного белка миелина, например из белка амилоидного пептида, или

 45 антигенов трансплантата, например аллоантигенов. Антиген может включать в себя пептиды или полипептиды, полученные из белков, а также фрагменты следующих соединений: сахара, белки, полинуклеотиды и олигонуклеотиды, аутоантигены, белок амилоидного пептида, антигены трансплантата, аллергены или другие

 50 макромолекулярные компоненты. В некоторых случаях в антигенную композицию включают более одного антигена.

Например, требуемые вакцины для регуляции реакций на аллергены в хозяине-позвоночном, которые содержат адъювантные комбинации по изобретению,

включают вакцины, содержащие аллерген или его фрагмент. Примеры таких аллергенов описаны в патенте США № 5830877 и публикации международной патентной заявки № WO99/51259, которые включены в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте, и включают пыльцу, яды насекомых, перхоть животных, споры грибов и лекарственные средства (такие как пенициллин). Вакцины препятствуют продукции антител IgE, известной причине аллергических реакций. В другом примере требуемые вакцины для профилактики или лечения заболевания, характеризующегося отложением амилоида у хозяина-позвоночного, которые содержат адъювантные комбинации по изобретению, включают вакцины, содержащие части белка амилоидного пептида (APP). Данное заболевание называется по-разному: болезнь Альцгеймера, амилоидоз или амилоидогенное заболевание. Таким образом, вакцины по изобретению включают адъювантные комбинации по изобретению плюс пептид A β , а также фрагменты пептида A β и антитела против пептида A β или их фрагменты.

Способы 1) отрицательной регуляции функции антигенпредставляющей клетки и 2) комбинированной терапии для управления иммуносупрессией хорошо известны в данной области (см., например, Xiao et al. (2003) Dendritic cell vaccine design: strategies for eliciting peripheral tolerance therapy of autoimmune diseases. *BioDrugs* 17:103-11; Kuwana (2002) Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* 63:1156-63; Lu et al. (2002) Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 73:S19-S22; Rifle et al. (2002) Dendritic cells and second signal blockade: a step toward allograft tolerance. *Transplantation* 73:S1-S2; Mancini et al. (2004) The management of immunosuppression: the art and the science. *Crit. Care. Nurs.Q.* 27:61-64).

Другой аспект настоящего изобретения соответственно относится к наборам для проведения комбинированного введения антагонистов GITR (например, ингибиторных полинуклеотидов GITRL, низкомолекулярных антагонистов и/или нейтрализующих антител против GITR и/или GITRL) с другими терапевтическими соединениями. В одном из вариантов осуществления набор включает одно или несколько связующих средств, составленных в фармацевтический носитель, и, по меньшей мере, одно средство, например терапевтическое средство, составленных, как надлежит, в один или несколько фармацевтических препаратов.

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими примерами, относящимися к новой мышине кДНК, обозначенной как кДНК мышинового GITRL, кодирующей новый полипептидный лиганд, обозначенный как мышинный GITRL, а также новыми антителами против GITRL. Специалисту в данной области будет очевидно, что принципиальные подходы, представленные примерами, могут применяться ко всем гомологам мышинового GITRL.

Примеры

Следующие примеры приведены для облегчения понимания изобретения, но никоим образом не предназначены для ограничения его объема и не должны рассматриваться таким образом. Примеры не включают в себя подробного описания общепринятых способов, таких как проточная цитометрия (например, FACS), ПЦР, нозерн-гибридизация и гибридизация *in situ*, или способов, используемых при конструировании векторов, встраивании генов, кодирующих полипептиды, в такие векторы и плазмиды, введении таких векторов и плазмид в клетки-хозяева и экспрессии полипептидов с таких векторов и плазмиды в клетках-хозяевах. Такие способы хорошо известны обычным специалистам в данной области.

Пример 1**Идентификация последовательностей ДНК GITRL**

Пример 1.1. Идентификация кДНК мышинового GITRL и геномных последовательностей

5 Два подхода предпринимали для идентификации мышинового гомолога GITRL. В одном подходе аминокислотную последовательность человеческого GITRL (из инвентарного № GenBank AX077015) использовали в поиске Tblastn против данных div1; div2; div3; div4; gbdiv_cu; Celera mouse (cm); и draft_mouse-dna. Геномную последовательность ga_69772862.cm_4 идентифицировали как одну из возможных соответствующих последовательностей, подлежащих исследованию. Пропущенные аминокислотные последовательности идентифицировали в поиске Tblastn с аминокислотной последовательности человеческого GITRL (инвентарный № GenBank AX077015) против незамаскированного объединенного мышинового генома Celera (cm) с использованием значения ожидания (E)=10 (по умолчанию), 100 и 1000. Геномную последовательность ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2 идентифицировали как геномную последовательность, содержащую пропущенные аминокислотные последовательности.

В другом подходе аминокислотную последовательность человеческого GITRL (из инвентарного номера GenBank NM005092) использовали в поиске Tblastn против незамаскированного объединенного мышинового генома Celera (cm) с использованием значения ожидания (E)=10 (по умолчанию) и 1000. Геномную последовательность ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2 идентифицировали как геномную последовательность, содержащую три области с парой с высоким счетом (HSP).

25 Предполагаемую мышиную последовательность ДНК конструировали на основе трех областей с HSP, полученных в описанном выше поиске Tblastn. Данную последовательность кДНК редактировали на основе сравнения выравнивания трех человеческих экзонных последовательностей с соответствующей человеческой геномной последовательностью от Celera (ga_x2htbl3vud5_66.ch_r25h_1) и трех производных мышинных предполагаемых экзонных последовательностей с соответствующей мышинной геномной последовательностью от Celera (ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2). Данное редактирование учитывало сплайсинговые соединения человеческой последовательности. Отредактированная последовательность кДНК мышинового GITRL содержала открытую рамку считывания длиной 519 н.п. (кодирующая последовательность 522 н.п.), соответствующую белку длиной 173 аминокислот.

Праймеры конструировали на основе предполагаемых экзонов геномной последовательности мышинового GITRL и использовали для выделения соответствующего физического клона кДНК из библиотеки кДНК мышинового тимуса посредством ПЦР. Последовательности прямого (SEQ ID NO:4) и обратного (SEQ ID NO:5) ПЦР-праймера представляли собой:

5'ATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG 3' (прямой праймер) и

5'GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG 3' (обратный праймер).

Полученный в результате фрагмент субклонировали и определяли его ДНК-последовательность с использованием стандартных способов. Полученный в результате фрагмент подтверждал существование кДНК мышинового GITRL, содержащей все три предсказанных экзона (см. ниже). Данный фрагмент продлевали, чтобы включить конечный кодирующий фрагмент (две аминокислоты) кДНК путем ПЦР-амплификации данного полученного в результате клона кДНК.

Последовательности прямого (SEQ ID NO:6) и обратного (SEQ ID NO:7)

ПЦР-праймеров для данной стадии представляли собой:

5'TTTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG 3' (прямой праймер), и
5'TTTAAAGAATTCTCATTAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT 3' (обратный
праймер).

Прямой ПЦР-праймер содержал участок SalI, последовательность Kozak для
инициации трансляции и ATG, кодирующий инициаторный метионин. Обратный
праймер содержал участок EcoRI. Участки SalI и EcoRI использовали для
направленного субклонирования и проводили определение последовательности
конечного клона кДНК.

Полноразмерная последовательность кДНК мышинового GITRL и ее предсказанная
аминокислотная последовательность приведены в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2
соответственно.

Выравнивание последовательностей кДНК человеческого GITRL (SEQ ID NO:8) и
кДНК мышинового GITRL выявляло 69,6% идентичность. Выравнивание
аминокислотных последовательностей человеческого GITRL (SEQ ID NO:9) и
мышинового GITRL (фиг.1) выявляло 54,1% идентичности и 60,0% сходства. Данная
степень аминокислотной идентичности является сходной с той, которая существует, в
общем, между мышинными и человеческими гомологами других лигандов TNFR
(Oshima et al. (1998) Int. Immunol. 10:517-26).

Сравнение клонированной последовательности кДНК мышинового GITRL (SEQ ID
NO:1) с доступными мышинными базами данных выявило единичный нуклеотидный
полиморфизм (SNP) в кодирующей области мышинового GITRL (перестановка A/C в
нуклеотидном положении 470 или SEQ ID NO:1 в экзоне 3, которая приводит к замене
аспарагина на треонин в аминокислотном положении 157 SEQ ID NO:2).

Сравнение последовательности кДНК мышинового GITRL с последовательностью
генома мыши от Celera (ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2), описанной выше, выявило, что
локус мышинового GITRL содержит три экзона и два интрона (см. таблицу 2 ниже) с
размером и положением экзонов, консервативным в человеческом и мышинном GITRL.
Геномная ДНК-последовательность мышинового GITRL приведена в SEQ ID NO:3.

Таблица 2			
Область в SEQ ID NO:3	Свойство последовательности	Длина (н.п.)	Положение в SEQ ID NO:1
1-255	5'-последовательность	255	-
256-390	Экзон № 1	135	1-135
391-6010	Инtron № 1	5620	-
6011-6044	Экзон № 2	34	136-169
6045-8990	Инtron № 2	2946	-
8991-9340	Экзон № 3	350	170-519
9341-9343	Стоп	3	520-522
9344-10289	3'-последовательность	946	-

Сравнение геномной структуры мышинового GITRL (таблица 2) с геномной
структурой человеческого GITRL (см. таблицу 3 ниже) показывает, что размер экзонов
и положение интронов консервативны в геномных ДНК-последовательностях
человеческого и мышинового GITRL. Геномная ДНК-последовательность
человеческого GITRL приведена в SEQ ID NO:10.

Таблица 3			
Область в SEQ ID NO:10	Свойство последовательности	Длина (н.п.)	Положение в SEQ ID NO:8
1-421	5'-последовательность	421	-
422-577	Экзон № 1	156	1-156

578-7348	Инtron № 1	6771	-
7349-7379	Экзон № 2	31	157-187
7380-9604	Инtron № 2	2225	-
9605-9948	Экзон № 3	344	188-531
9949-9951	Стоп	3	532-534
9952-10331	3'-последовательность	380	-

Пример 1.2. Профиль гидрофобности мышиног GITRL

Профиль гидрофобности мышиног GITRL определяли посредством TopPred (Claros and von Heijne (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:685-6). График коэффициента гидрофобности по аминокислотным остаткам мышиног GITRL (SEQ ID NO:2) выявил единичную предполагаемую гидрофобную область, расположенную примерно между аминокислотами 25-50, что сходно с человеческим GITRL. Данный гидрофобный сегмент соответствует предсказанной трансмембранной области для трансмембранных белков типа II.

Пример 2

Экспрессия мышиног GITRL в ткани

Олигонуклеотидные зонды, основанные на последовательности кДНК мышиног GITRL (SEQ ID NO:1) применяли для тестирования нескольких образцов мышинной ткани на предмет экспрессии GITRL путем нозерн-гибридизации и ПЦР в реальном времени (например, Heid et al. (1996) Genome Res. 6:986-94; Mullah et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26:1026-31; Giulietti et al. (2001) Methods 25:386-401).

Хотя при нозерн-гибридизации выявлялись едва детектируемые транскрипты в сердце, селезенке, легком, лимфатическом узле, почке и печени, при последующей гибридизации in situ выявляли экспрессию GITRL в сердце, селезенке, лимфатическом узле и тимусе. Экспрессия GITRL в данных тканях, в основном, ограничивалась перикардальными и эндокардиальными клетками сердца, белой пульпой селезенки, корковой, околокорковой и мозговой зонами лимфатических узлов, и корковой и мозговой зонами тимуса.

Экспрессию GITRL в тимусе, селезенке и лимфатическом узле далее подтверждали путем ПЦР-анализа в реальном времени. GITRL экспрессировался на наиболее высоком уровне в селезенке и в стимулированных липополисахаридом (ЛПС) клетках селезенки, которые являются первичными В-лимфоцитами. Исчезающе низкий уровень экспрессии GITRL выявлялся в желудке, головном мозге и почках. ПЦР-анализ в реальном времени также выявлял транскрипты GITRL в печени, активированных CD25⁻ клетках, активированных CD25⁺ клетках и активированных конканавалином А клетках лимфатического узла, хотя в меньшей степени, чем в селезенке и ЛПС-бластах. Не выявляли экспрессии GITRL в покоящихся CD25⁻ или CD25⁺ клетках. ПЦР-анализ в реальном времени зрелых и стимулированных ЛПС дендритных клеток (DC) костно-мозгового происхождения также демонстрировал фоновую экспрессию GITRL незрелыми DC, которая повышалась после стимуляции ЛПС в течение 24 часов, но уменьшалась ниже фона через 48 часов стимуляции ЛПС. Экспрессию GITRL также выявляли в различной степени во всех тестируемых линиях эндотелиальных клеток (bEND3, C166, EOMA, MSI и SVEC4-10), и, как было продемонстрировано, она оставалась относительно неизменной, когда клеточные линии стимулировали ЛПС. кДНА GITRL, наоборот, не выявляли путем ПЦР в следующих нестимулированных мышинных клеточных линиях установленного происхождения: линия Т-клеток E10, фетальная тимусная линия T2, плазмацитома T10, тимомы EL4, пре-В-клеточные линии BAF3 и PREB, В-клеточная гибридома B9,

моноцитарная DA1G, моноцитарная MI, FBMD-1 фетального костного мозга, эмбриональная карцинома P19, MDF из печени и линия эмбриональных стволовых клеток E14.

Пример 3

Функциональная экспрессия рекомбинантного мышинового GITRL

Пример 3.1. Связывание GITRL с G1TR клеточной поверхности

Для определения того, кодирует ли выделенная в примере 1 мышинная кДНК функциональный лиганд G1TR (GITRL), клетки Cos, экспрессирующие мышинный GITRL, слитый с эпитопом FLAG (GITRL-Flag-Cos), или контрольный мышинный рецептор IL-21, слитый с эпитопом FLAG (IL-21R-Flag-Cos), инкубировали в течение различных отрезков времени с клетками 293T, экспрессирующими мышинный G1TR (G1TR-293T). Взаимодействие клетка-клетка выявляли путем проточной цитометрии с использованием меченного фикоэритрином антитела против Flag (PE-FLAG) и меченного флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитела против G1TR. Даже через 1 мин после совместного центрифугирования клеток G1TR-293T и GITRL-Flag-Cos ~90% клеток G1TR-293T (выявляемых посредством FITC-флуоресценции) совместно окрашивались анти-FLAG (что выявлено путем флуоресценции PE), указывая на то, что клетки G1TR-293T связывались с клетками GITRL-Flag-Cos, и данное взаимодействие сохранялось в течение всех 60 мин эксперимента. Наоборот, клетки G1TR-293T, инкубированные с клетками IL-21R-Flag-Cos, значимо не окрашивались анти-FLAG, даже через 60 мин после совместного центрифугирования. Эти данные демонстрируют, что мышинная кДНК, выделенная в примере 1, кодирует функциональный GITRL, способный связывать G1TR клеточной поверхности.

Пример 3.2. Связывание GITRL с растворимым G1TR

Способность мышинового GITRL связывать G1TR подтверждали путем инкубации клеток Cos, экспрессирующих мышинный GITRL (GITRL-Cos), или клеток Cos с моск-трансфекцией рекомбинантным G1TR, слитым с Fc-частью человеческого IgG (G1TR-Fc) или контрольным человеческим IgG (HIgG). Связывание G1TR-Fc с GITRL определяли путем проточной цитометрии с использованием антитела осла против человеческого антитела, конъюгированного с FITC (FITC-Ab). Инкубация клеток GITRL-Cos с G1TR-Fc приводила к 3,6-кратному увеличению связывания FITC-Ab (28,8%) по сравнению с инкубацией клеток GITRL-Cos с контрольным HIgG (7,9%). Неокрашенные клетки GITRL-Cos, клетки GITRL-Cos, инкубированные со слитым белком CTLA-4:Fc и FITC-Ab, и клетки GITRL-Cos, инкубированные только с FITC-Ab, не характеризовались флуоресценцией. Ни обработанные клетки Cos, ни клетки Cos с моск-трансфекцией не характеризовались какой-либо заметной флуоресценцией. Эти данные демонстрируют, что мышинная кДНК, выделенная в примере 1, кодируют функциональный GITRL, способный связывать растворимый G1TR.

Пример 4

Связывание мышинового GITRL с G1TR приводит к пролиферации клеток CD4⁺CD25⁺

Эффект связывания GITRL:G1TR на клеточную пролиферацию определяли путем стимуляции ~50000 мышинных Т-клеток посредством ~50000 облученных истощенных по Т-клеткам спленцитов и 100 МЕ/мл IL-2 в течение 65-72 ч в отсутствие или присутствии различных концентраций G1TR-связывающего белка. Два G1TR-связывающих белки использовали в данных анализах: агонистическое антитело против G1TR (см., например, McHugh et al. (2002) Immunity 16:311-23; см. также заявку патент США 10/194754) или мышинный GITRL, экспрессированный на поверхности

модифицированных леток YB2/0 (GITRL-YB2/0). Клеточную пролиферацию анализировали посредством введения 1 мкКи ^3H -тимидина в течение последних 6-12 ч культивирования и последующего измерения включения ^3H -тимидина с использованием сцинтилляционного счетчика.

Как показано на фиг.2А, $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Т-клетки не отвечали на любую концентрацию антитела против GITR. Наоборот, антитело против GITR стимулировало пролиферацию $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клеток во всех тестируемых концентрациях. Например, культивирование $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клеток в присутствии наиболее низких тестируемых титров антитела против GITR (~0,02 мкг/мл) приводило к ~3-кратному повышению включения ^3H -тимидина (~15000 имп/мин) по сравнению с клетками, культивированными в отсутствие антитела против GITR. Способность антитела против GITR стимулировать пролиферацию $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клеток достигало плато, равного ~45000 имп/мин при концентрации антитела ~0,3 мкг/мл, соответствующей ~9-кратному повышению включения ^3H -тимидина по сравнению с клетками, культивируемыми в отсутствие антитела против GITR.

По аналогии с результатами, полученными с антителом против GITR, клетки GITRL-YB2/0 не стимулировали пролиферацию $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Т-клеток (фиг.2В). Наоборот, клетки GITRL-YB2/0 заметно стимулировали пролиферацию $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клеток. Например, культивирование $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клеток в присутствии ~10000 клеток GITRL-YB2/0 приводило к ~4-5-кратному возрастанию включения ^3H -тимидина по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии равного количества немодифицированных клеток YB2/0. Увеличение количества клеток YB2/0 до ~50000 приводило к ~15-кратному повышению включения ^3H -тимидина по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии равного количества немодифицированных клеток YB2/0 (фиг.2В).

Пример 5

Связывание мышинового GITRL с GITR отменяет опосредованную $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клетками супрессию $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Т-клеток

Анализ супрессии Т-клеток, применяемый в данных примерах, был описан ранее (см., например, Thornton and Shevach (2000) J. Immunol. 164:183-90; McHugh et al. (2002) Immunity 16:311-23; оба источника включены в данное описание в качестве ссылки). В кратком изложении, ~50000 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ отвечающих Т-клеток культивировали в присутствии ~50000 облученных, истощенных по Т-клеткам спленоцитов, 0,5 мг/мл антитела против CD3 и различных количеств свежевыделенных супрессорных $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клеток. Затем анализировали способность ~50000 облученных клеток GITRL-YB2/0 или 2 мкг/мл агонистического антитела против GITR отменять супрессию пролиферации $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ путем измерения включения ^3H -тимидина на сцинтилляционном счетчике.

Как показано на фиг.3А, $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ клетки снижали пролиферацию $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ клеток зависимым от дозы образом. И антитело против GITR, и клетки GITRL-YB2/0 были способны полностью отменять супрессию $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ в любом тестируемом интервале количества супрессорных $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ клеток. Таким образом, связывание GITRL с его рецептором GITR, как и связывание агонистического антитела против GITR с GITR, блокировало супрессорную функцию $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ клеток. Способность клеток GITRL-YB2/0 отменять супрессию реализовывалась независимым

от дозы образом, так что такое малое количество, как ~3000 клеток GITRL-YB2/0, по меньшей мере, частично отменяло или снижало супрессию в данном анализе (фиг.3B). Ни немодифицированные YB2/0, ни клетки YB2/0, экспрессирующие GITR, не имели заметного эффекта на опосредованную $CD4^+CD25^+$ Т-клетками супрессию (фиг.3A).

В отличие от результатов, полученных на свежевыделенных $CD4^+CD25^+$ Т-клетках, связывание GITRL:GITR характеризовалось малым эффектом до его отсутствия в отношении супрессии, опосредованной $CD4^+CD25^+$ Т-клетками, активированными антителом против CD3, истощенными по Т-клеткам спленocyтaми, и IL-2 (фиг.4). Ни добавление антитела против GITR, ни добавление ~50000 клеток GITRL-YB2/0 не могло отменять супрессию, опосредованную ~25000 активированными $CD4^+CD25^+$ Т-клетками. Когда активированные $CD4^+CD25^+$ Т-клетки добавляли в анализ (например, ~1500-12500 клеток), однако антитело против GITR и клетки GITRL-YB2/0 могли частично снижать, но не полностью отменять супрессию.

Пример 6

Антитело против GITRL восстанавливает супрессию, опосредованную $CD4^+CD25^+$ Т-клетками

Пример 6.1. Выделение антител против мышиногo GITRL

Антитела, специфичные в отношении мышиногo GITRL, продуцировали путем иммунизации крыс крысиными клетками YB2/0, экспрессирующими мышиную кДНК GITRL (GITRL-YB2/0). С использованием способов, известных в данной области, создавали гибридомы антитела и подвергали скринингу против клеток Phoenix, экспрессирующих мышиный GITRL с использованием проточной цитометрии. Идентифицировали два антитела, 5F1 и 10F12, которые специфично связывались с клетками GITRL-Phoenix и не связывались с контрольными клетками Phoenix с имитацией трансфекции. Данные гибридомы антитела были депонированы в American Type Culture Collection (ATCC) 22 июля 2003 г.; учетный номер ATCC для гибридомы 5F1 - PTA-5336 и PTA-5337 для гибридомы 10F12.

Пример 6

Пример 6.2. Антитела против мышиногo GITRL блокируют эффекты GITRL на супрессорную активность $CD4^+CD25^+$ Т-клеток

Как описано выше в примере 5, клетки YB2/0, экспрессирующие GITRL на их клеточной поверхности, способны отменять супрессию пролиферации $CD4^+CD25^-$ Т-клеток, опосредованную свежевыделенными $CD4^+CD25^+$ Т-клетками. Для определения того, могут ли антитела против GITRL восстанавливать опосредованную $CD4^+CD25^+$ Т-клетками супрессию, проводили анализ супрессии Т-клеток, как описано в примере 5, в присутствии или в отсутствие антитела против GITRL 5F1 или 10F12 или контрольных антител.

Как показано в примере 5, культивирование отвечающих $CD4^+CD25^-$ Т-клеток и свежевыделенных $CD4^+CD25^+$ супрессорных Т-клеток в присутствии клеток GITRL-YB2/0 приводило к полной отмене супрессии пролиферации $CD4^+CD25^-$ (фиг.5A и 5B). Добавление 10% образцов гибридомной культуральной надосадочной жидкости, содержащих антитело против GITRL 5F1, в анализ приводило к частичному (фиг.5B) до почти полного (фиг.5A) восстановления опосредованной $CD4^+CD25^+$ супрессии. Добавление антитела против GITRL 10F12 дало сходные результаты. Как и ожидалось, присутствие контрольных антител («контрольного Ig») не имело подходящего эффекта на способность клеток GITRL-YB2/0 отменять супрессию (фиг.5B). Эти

данные демонстрируют, что антитела против GITRL блокируют способность GITRL выключать супрессорную активность $CD4^+CD25^+$ клетки.

Пример 6.3. Антитела против мышинового GITRL супрессируют Т-клеточные реакции только в присутствии $CD4^+CD25^+$ Т-клеток

Культуры клеток лимфоузлов стимулировали в присутствии различных концентраций агонистического антитела против CD3 перед (фиг.6А) или после истощения (фиг.6В) $CD4^+CD25^+$ Т-клеток и измеряли пролиферацию путем определения включения 3H -тимидина на сцинтилляционном счетчике. Для определения эффектов антитела против GITRL на пролиферацию 10% образцы гибридной культуральной надосадочной жидкости, содержащие антитело против GITRL 5F1, добавляли к параллельным культурам.

Как показано на фиг.6А, добавление антитела против GITRL подавляло пролиферацию клеток лимфатического узла, содержащих $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, где клетки стимулировали концентрацией от ~0,075 мкг/мл до ~0,75 мкг/мл антитела против CD3. Супрессию не наблюдали в присутствии антитела против GITRL, когда клетки лимфатического узла, содержащие $CD4^+CD25^+$ Т-клетки, стимулировали 1,0 мкг/мл антитела против CD3. В отличие от результатов, полученных с культурами клеток лимфоузла, содержащими $CD4^+CD25^+$ Т-клетки, добавление антитела против GITRL, в общем, не оказывает супрессорного действия на клеточные культуры лимфатического узла, которые истощены по $CD4^+CD25^+$ Т-клеткам (фиг.6В). Все вместе эти данные указывают на то, что антитело против GITRL блокирует взаимодействие между GITR, экспрессированным на $CD4^+CD25^+$ Т-клетках, и GITRL, экспрессированном на других клетках, и что блокада данного взаимодействия GITR/GITRL усиливает регуляторную функцию $CD4^+CD25^+$ Т-клеток по восстановлению иммуносупрессии.

Пример 7

Распределение экспрессирующих GITRL клеток в лимфоидных тканях

Агонистическое антитело против GITRL использовали для оценки экспрессии GITRL в мышинных тканях посредством проточной цитометрии. Свежевыделенные субпопуляции $CD11c^+$ дендритных клеток (DC) селезенки, экспрессирующих только CD4, только CD8 или и CD4, и CD8, конститутивно экспрессировали GITRL на низком уровне (фиг.7А). Однако поверхностная экспрессия GITRL была заметно выше среди $CD11c^{low}$ B220⁺ плазмацитоподобных дендритных клеток (Nakano et al., 2001). На фиг.7В окрашивание mAb против GITRL или контролем изотипа проводили на указанных субпопуляциях свежевыделенных $CD11c^+$ DC селезенки из мышей BALB/c.

Сходным образом, свежевыделенные B220⁺ В-клетки селезенки конститутивно экспрессировали GITRL, как и перитонеальные В-1 В-клетки (perC $CD11b^+B220^+$), хотя на более высоком уровне (фиг.7С, сверху). Было обнаружено, что покоящиеся перитонеальные макрофаги (perC $CD11b^+B220^-$) также экспрессировали данный лиганд (фиг.7С, внизу).

Субпопуляции тимоцитов, прошедшие селекцию, не экспрессировали измеряемого количества GITRL (фиг.7D). В отличие от этого, как показано на фиг.7Е, экспрессия GITRL выявлялась на всех субпопуляциях $CD4^-CD8^-$ тимусных предшественников при экспрессии на наиболее высоком уровне в $CD44^+CD25^+$ (R2) и $CD44^-CD25^+$ (R3) субпопуляциях.

GITRL не выявляли на нестимулированных клетках лимфоузлов (фиг.7F). GITRL

также не выявляли на нестимулированных Т-клетках селезенки (данные не показаны). Эти данные демонстрируют экспрессию GITRL профессиональными антигенпредставляющими клетками (DC, В-клетки и макрофаги; фиг.7А-7С) и тимусными CD4⁺CD8⁻ клетками-предшественниками (фиг.7Е), но не Т-клетками, прошедшими селекцию (фиг.7D), или покоящимися Т-клетками на периферии (нестимулированные клетки лимфатического узла и селезенки; фиг.7F, и данные не показаны). Эти данные соответствовали данным, полученным путем нозерн-гибридизации, гибридизации *in situ* и ПЦР в реальном времени, как описано в примере 2 (выше).

Пример 8

APC отрицательно регулируют GITRL после стимуляции TLR

Эффекты активации В-клеток на экспрессию GITRL оценивали после обработки лигандами Toll-подобного рецептора (TLR) или анти-CD40 и IL-4, или анти-IgM. Стимуляция В-клеток селезенки (B220⁺ спленоцитов) или перитонеальных В-1 В-клеток (B220⁺CD11b⁺ PerC) приводила к быстрой, но преходящей положительной регуляции GITRL, которая была заметна через 4 часа при большинстве видов обработки (фиг.8А). После 48-60 часов стимуляции экспрессия падала до уровня ниже того, что был до стимуляции, и стабилизировалась. Исключением были обработанные polyI:C В-1 В-клетки из полости брюшины, которые не характеризовались указанной отрицательной регуляцией в течение оцениваемых отрезков времени. Как и ожидалось, в ходе эксперимента во всех группах повышался уровень CD86, и это указывало на то, что наблюдаемая отрицательная регуляция GITRL не являлась вторичной по отношению к клеточной гибели (данные не показаны).

Снижение GITRL, экспрессированного В-клетками, после обработки анти-CD40 и IL-4 указывало на то, что экспрессия может модулироваться после предоставления Т-клеточной помощи. Экспрессию GITRL В-клетками среди всех спленоцитов оценивали после культивирования с антителом против CD3. В данных условиях культивирования экспрессия GITRL на B220⁺ спленоцитах также отрицательно регулировалась через 48 часов (фиг.8В). Так, физиологический уровень Т-клеточной активности также приводил к снижению экспрессии GITRL В-клетками селезенки.

CD11c⁺ DC селезенки обогащали посредством магнитных гранул и оценивали на предмет экспрессии GITRL через 12 и 36 часа культивирования в присутствии ЛПС. DC, культивированные в среде или ЛПС, экспрессировали GITRL в течение исходных 12 часов, с умеренной положительной регуляцией, индуцируемой ЛПС. Однако через 36 часов экспрессия GITRL не выявлялась на обработанных ЛПС DC, а также на тех, которые культивировали только в среде. На фиг.8С показана экспрессия GITRL (верхние панели гистограммы) и CD86 (В7.2) (нижние панели гистограммы) очищенными CD11c⁺ DC после культивирования с ЛПС (0,5 мкг/мл) и без него в указанные моменты времени. Как показано, экспрессия CD86 (В7.2) положительно регулировалась, как и ожидалось (Banchereau and Steinman, 1998). Снижение экспрессии GITRL DC селезенки, культивируемые в среде, указывает на то, что «спонтанного» созревания DC, которое происходит во время культивирования *in vitro* (Vremes and Shortman, 1997), достаточно для отрицательной регуляции экспрессии GITRL. По этой причине показаны только результаты после стимуляции ЛПС, хотя DC подвергали тем же видам обработки, показанным для В-клеток. Сходно с результатами другого опубликованного отчета (Tone et al., 2003), было

обнаружено, что полученные из костного мозга DC экспрессируют GITRL конститутивно и что такая экспрессия лишь минимально снижается после обработки различными лигандами TLR (данные не показаны).

И CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки экспрессировали измеряемые уровни GITRL после 48-часового культивирования со спленоцитами в отсутствие («+Med.») или в присутствии («+aCD3») растворимого антитела против CD3 (фиг.8D), что подтверждало полученные ранее результаты ПЦР в реальном времени (см. также пример 2).

Пример 9

Блокада взаимодействия GITR/GITRL ингибирует пролиферацию лимфоцитов

Поскольку GITRL конститутивно экспрессировался APC и поскольку взаимодействия GITR/GITRL, как предполагается, отменяют супрессорные функции CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, тестировали способность антитела против GITRL усиливать супрессию, опосредованную эндогенной популяцией CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, присутствующих во вторичных лимфоидных органах. Проводили сравнение пролиферативных реакций общих клеток лимфатического узла (LN), общих спленоцитов (Sp) и LN или Sp с истощением по CD25⁺ клеткам ($\Delta 25$), причем каждую популяцию культивировали с антителом против GITRL (закрашенные кружки) или с контрольным антителом (IgG крысы; незакрашенные кружки). Добавление антитела против GITRL снижало пролиферативный ответ общих клеток лимфоузла (фиг.9А, вверху слева) и, в меньшей степени, общих спленоцитов (фиг.9А, внизу слева). Однако ингибиторный эффект также был очевидным в культурах, истощенных по CD25⁺ клетками (фиг.9А, вверху справа (LN); внизу справа (Sp)), и это создает возможность того, что взаимодействия GITR/GITRL предоставляют костимуляторные сигналы для CD25⁺ Т-клеток.

Для прямого тестирования данной возможности пролиферативные реакции очищенных CD4⁺CD25⁺ и CD8⁺ Т-клеток оценивали в присутствии APC и клеток YB2/0, экспрессирующих GITRL. Пролиферация CD4⁺CD25⁺ и CD8⁺ Т-клеток, по существу, усиливалась в присутствии экспрессирующих GITRL клеток (фиг.9В), что было, в частности, очевидно при низких концентрациях анти-CD3 для CD4⁺CD25⁺ Т-клеток.

То, что антитело против GITR опосредует свои эффекты путем действия на CD4⁺CD25⁺ Т-клетки, может показаться противоречивым, поскольку покоящиеся Т-клетки экспрессируют лишь небольшие количества GITR. Однако данное противоречие разрешается демонстрацией того, что экспрессия GITR быстро регулируется на повышение после активации Т-клеток (фиг.9С), достигая максимальных уровней между 48 и 72 часами после активации. Данные результаты поддерживают возможность того, что взаимодействия GITR/GITRL могут влиять на активацию CD4⁺CD25⁺ Т-клеток независимо от регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток.

Пример 10

Отмена супрессии требует экспрессии GITR CD25⁺ Т-клетками

Предшествующие исследования указывали на то, что нефункциональное связывание GITR на CD4⁺CD25⁺ Т-клетках ингибировало их супрессорные способности (McHugh et al, 2002; Shimizu et al., 2002). Однако поскольку активированные Т-клетки также экспрессируют GITR, авторы попытались определить соответствующую(ые) клеточную(ые) мишень(и) вовлечения GITR, приводящего к отмене супрессии. Пролиферацию измеряли в присутствии или в отсутствие mAb против GITR (DTA-1) в совместных культурах с использованием комбинаций

CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ Т-клеток из *GITR*^{+/+} и *GITR*^{-/-} мышей (фиг.10). Как сообщалось ранее (Shimizu et al., 2002), когда и CD4⁺CD25⁺, и CD4⁺CD25⁻ Т-клетки экспрессировали GITR, добавление mAb против GITR в совместные культуры приводило к повышению пролиферативного ответа по сравнению с совместными культурами, получавшими антитело изотипа (фиг.10А, панель а). Когда CD4⁺CD25⁻, но не CD4⁺CD25⁺ Т-клетки экспрессировали GITR в совместных культурах, добавление антитела против GITR приводило к усилению Т-клеточной пролиферации сходно с тем, которое наблюдается, когда CD4⁺CD25⁺ Т-клетки экспрессируют GITR (фиг.10А, панель б). Однако в совместных культурах CD4⁺CD25⁻ *GITR*^{-/-} и CD4⁺CD25⁺ *GITR*^{+/+} Т-клеток добавление антитела против GITR не имело эффекта на пролиферацию (фиг.10А, панель с). Как и ожидалось, добавление антитела против GITR к совместным культурам CD4⁺CD25⁻ *GITR*^{-/-} и CD4⁺CD25⁺ *GITR*^{-/-} Т-клеток также не имело эффекта на пролиферацию Т-клеток (фиг.10А, панель d). Результаты, сходные с теми, которые описаны выше, были получены с препаратом антитела против mGITR, полученного коммерчески (данные не показаны).

Сильный аргумент в поддержку гипотезы о том, что отмена супрессии являлась последствием нефункционального связывания GITR, экспрессированного CD4⁺CD25⁺ Т-клетками, был получен в предшествующем исследовании, в котором использовали комбинации крысиных отвечающих клеток и мышинных CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток (Shimizu et al., 2002). mAb против GITR (DTA-1), использованное в данных исследованиях, получали у крысы, и, следовательно, не связывалось с клетками крысы (id.). Эксперименты, аналогичные тем, что описаны выше, проводили с использованием совместных культур крысиных CD4⁺CD25⁻ отвечающих клеток, мышинных CD4⁺CD25⁺ супрессоров и облученных крысиных APC (фиг.10В, панель б). Совместно культивируемые CD4⁺CD25⁻ отвечающие клетки, мышинные CD4⁺CD25⁺ супрессоры и облученные APC крысы включали в качестве контроля (фиг.10В, панель а). Сходно с данными, полученными от мышей *GITR*^{-/-}, отмены опосредованной CD4⁺CD25⁺ супрессии не происходило (фиг.10В, панель б), кроме ситуации, когда GITR на отвечающей CD25⁻ популяции мог перекрестно связываться (фиг.10В, панель а).

Дальнейший анализ системы крыса/мышь выполняли путем оценки разведения CFSE при совместном культивировании крысиных CD4⁺CD25⁻ и мышинных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток посредством проточной цитометрии. В присутствии антитела контроля изотипа крысиные CD4⁺CD25⁻ Т-клетки лишь частично супрессировались мышинными CD4⁺CD25⁺ Т-клетками при совместном культивировании в соотношении супрессоров к отвечающим клеткам 1:8 (фиг.10С, левые панели гистограмм). Однако добавление антитела против GITR приводило к дополнительной экспансии мышинных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток и к последующему повышению супрессии крысиных Т-клеток (фиг.10С, правая панель гистограмм). Повышенное разведение CFSE мышинных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток после нефункционального связывания GITR может частично ингибироваться добавлением блокирующих антител против CD25, и это указывало на то, что IL-2, выделяемый вначале отвечающими Т-клетками, также требовался для данной экспансии (данные не показаны). Все вместе данные результаты недвусмысленно демонстрируют, что вовлечение GITR на отвечающих CD4⁺CD25⁻ Т-клетках требуется для преодоления супрессии, опосредованной CD4⁺CD25⁺

Т-клетками.

Пример 11

Экспрессия сигналов GITR требуется для регуляции и преодоления супрессии, опосредованной эндогенными регуляторными Т-клетками

Поскольку CD28 и GITR, как оказывается, предоставляют костимуляторные сигналы во время активации Т-клеток, авторы пытались определить, играют ли они различные роли во время первичного ответа. Авторы сравнили способность GITR и CD28 способствовать Т-клеточной пролиферации в присутствии или в отсутствие эндогенных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток лимфоузла и в присутствии или в отсутствие экзогенного IL-2 (фиг.11). Те же образцы, которые использовали для исследования пролиферации, одновременно оценивали на предмет разведения CFSE после 72-часового периода культивирования. В отсутствие экзогенного IL-2, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки из *GITR*^{-/-} и *CD28*^{-/-} животных не могли пролиферировать (фиг.11А, панель а). Клетки LN из животных *GITR*^{+/-} характеризовались промежуточным фенотипом по сравнению с животными дикого типа и *GITR*^{-/-} (фиг.11А, панель а). Ответ Т-клеток из мышей дикого типа значительно усиливался после истощения CD25⁺ Т-клеток, что указывало на то, что супрессия в данных условиях культивирования опосредовалась CD25⁺ Т-клетками, присутствующими в нормальном лимфоузле (фиг.11А, ср. панели а и b). Наиболее важно то, что в отсутствие CD4⁺CD25⁺ Т-клеток реакции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток лимфоузла из мышей *GITR*^{-/-} были сравнимыми с таковыми мышей дикого типа по оценкам включения ³Н-тимидина (фиг.11А, панель b) и разведения CFSE (фиг.11В, верхний набор панелей). Однако через 72 часа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки из животных *CD28*^{-/-} не пролиферировали даже в отсутствие CD4⁺CD25⁺ Т-клеток (фиг.11А, панель b).

Очень различный профиль ответа наблюдали при добавлении экзогенного IL-2 к культурам интактных клеток лимфоузла. Пролiferация CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток полностью ингибировалась в отсутствие GITR, что анализировали по захвату ³Н-тимидина (фиг.11А, панель с) или по недостаточному разведению CFSE (фиг.11В, средний набор панелей). Измеряемую пролиферацию Т-клеток из *CD28*^{-/-} животных, наоборот, выявляли посредством включения ³Н-тимидина (фиг.11А, панель с), хотя профиль CFSE демонстрировал, что в основном за измеренную пролиферацию были ответственны CD8⁺ Т-клетки (фиг.11В). В присутствии IL-2 (50 ед/мл) лимфатические узлы, истощенные по CD4⁺CD25⁺ Т-клеткам от всех животных, характеризовались сходными уровнями пролиферации, что оценено по включению ³Н-тимидина (фиг.11А, панель d) и разведению CFSE (фиг.11В, нижний набор панелей). Все вместе данные результаты указывают на то, что дефекты активации Т-клеток в *GITR*^{-/-} и *CD28*^{-/-} мышях являются различными.

Неспособность общих Т-клеток, присутствующих в лимфоузлах мышей *GITR*^{-/-}, пролиферировать в присутствии экзогенного IL-2, указывала на то, что у данных животных может затрагиваться экспрессия высокоаффинного рецептора IL-2. Поскольку экспрессия цепи IL-2Ra первично индуцируется его лигандом (Depper et al., 1985; Malek and Ashwell, 1985), способность активированных анти-CD3 CD4⁺CD25⁺ Т-клеток из мышей *GITR*^{-/-} экспрессировать данную цепь оценивали в присутствии или в отсутствие CD4⁺CD25⁺ Т-клеток и в присутствии или в отсутствие IL-2 (фиг.11С). В присутствии регуляторных Т-клеток добавление IL-2 к совместным культурам

приводило к усиленной экспрессии CD25 посредством *GITR*^{+/+}, но не *GITR*^{-/-} CD4⁺CD25⁻ Т-клеток через 24 часов (фиг.11С, нижняя правая панель гистограммы). Однако способность *GITR*^{-/-} CD4⁺CD25⁻ Т-клеток претерпевать индуцированную IL-2 экспрессию CD25 может легко восстанавливаться путем удаления CD4⁺CD25⁺ Т-клеток (фиг.11С, нижняя левая панель гистограммы). Таким образом, ослабление реакционной способности в отношении IL-2 в *GITR*^{-/-} Т-клетках в присутствии CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, по меньшей мере, частично была следствием их неспособности экспрессировать высокоаффинный рецептор IL-2 в присутствии концентраций экзогенного IL-2, достаточных для индукции экспрессии CD25 на клетках дикого типа.

Пример 12

CD28-зависимая стимуляция усиливает экспрессию и реакционную способность *GITR*

Хотя данные, представленные выше, указывали на то, что вовлечение *GITR* или CD28 на CD25⁻ Т-клетках предоставляло сигнал, который позволял отвечающим Т-клеткам избегать супрессии, природа сигнала, вовлеченного в данный процесс, оставалась неясной. Частичное сохранение пролиферативных реакций CD28^{-/-}CD8⁺ Т-клеток под воздействием IL-2 в присутствии CD4⁺CD25⁺ Т-клеток указывало на то, что передача сигнала CD28/B7 может регулировать чувствительность Т-клеток к взаимодействиям *GITR*/*GITRL*. Более того, в предшествующих исследованиях было продемонстрировано, что взаимодействия CD28⁻CD80/CD86 могут усиливать экспрессию некоторых представителей семейства TNFR (Gilfillan et al., 1998; Rogers et al., 2001). Таким образом, авторы оценивали данную способность в отношении *GITR*. Очищенные CD4⁺CD25⁻ и CD8⁺ Т-клетки из мышей *CD28*^{-/-} или мышей дикого типа оставались нестимулированными или активировались низкими концентрациями связанного с планшетом антитела против CD3 в присутствии или в отсутствие связанного с планшетом антитела против CD28 (фиг.12А). Хотя Т-клетки дикого типа, на которые воздействовало только анти-CD3, лишь слегка положительно регулировали *GITR*, экспрессия *GITR* CD4⁺CD25⁻ и CD8⁺ Т-клетками была сильно усилена включением анти-CD28.

Сходным образом, положительная регуляция экспрессии *GITR* на CD4⁺CD25⁻ Т-клетках заметно ингибировалась добавлением анти-CD80/CD86 (анти-B7.1/7.2) (фиг.12В, левая панель гистограммы). Ингибирование экспрессии *GITR* в культурах, содержащих анти-CD80/CD86, не была вторичной по отношению к сниженной продукции IL-2, поскольку положительная регуляция *GITR* CD4⁺CD25⁻ Т-клетками не предотвращалась в культурах, содержащих mAb анти-IL-2/IL-2R (фиг.12В (правая панель гистограммы)).

Усиленная экспрессия *GITR*, индуцированная происходящими от CD28 костимуляторными сигналами, была параллельна усиленной реакционной способности на передачу сигнала за счет *GITR* (фиг.12С). Добавление антитела против *GITR*, по существу, усиливало пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных Т-клеток из мышей дикого типа (фиг.12С, левые панели). Однако, когда к данным культурам добавляли анти-CD80/CD86, присутствие антитела против *GITR* лишь слабо повышало пролиферацию *GITR*^{+/+} CD4⁺CD25⁻ Т-клеток (фиг.12С, *GITR*^{+/+}, сверху слева; *GITR*^{-/-}, сверху справа) и *GITR*^{+/+}CD8⁺ Т-клеток (фиг.12С, *GITR*^{+/+}, внизу слева; *GITR*^{-/-}, внизу справа) в пределах тестируемого интервала концентраций анти-CD3. Обработка анти-*GITR* не влияла на реакции очищенных CD4⁺CD25⁻ и CD8⁺ Т-клеток из мышей *GITR*^{-/-} (фиг.12С, правые панели). Эти данные указывают на то, что

опосредованные CD28 сигналы, отличные от костимуляции продукции IL-2, усиливают экспрессию GITR и ослабляют опосредованную GITR передачу сигнала.

Пример 13

Связывание GITRL с GITR предоставляет костимуляторный сигнал эффекторным Т-клеткам

Четыреста тысяч эффекторных Т-хелперных клеток HT-2 (GITR⁺/TCR⁺) культивировали в отсутствие или в присутствии следующих реагентов: 1) покрытые анти-CD3 гранулы в соотношении 1:1 или 1:2, 2) десять тысяч клеток YB/2, которые не модифицированы для экспрессии GITRL (родительские YB2/0) или модифицированы для экспрессии GITRL (YB2/0 muGITRL), и 3) возрастающие концентрации антитела контроля изотипа или четырех различных антител против GITRL (5F1, MGTL-10, MGTL-15 или поликлональное антитело против GITRL). Пролиферацию измеряли по включению ³H-тимидина в течение последних 5 часов 4-часового периода культивирования. На фиг.13А продемонстрировано, что GITRL усиливает пролиферацию Т-клеток, стимулированных анти-CD3. Кроме того, опосредованное GITRL усиление Т-клеточной пролиферации может быть заблокировано антителом 5F1, но не антителом контроля изотипа (фиг.13В), и не коммерчески доступными MGTL-10, MGTL-15, и не поликлональными антителами против GITRL (фиг.13С). Эти данные предоставляют дальнейшие доказательства того, что GITRL предоставляет костимуляторный сигнал, а также что 5F1 представляет собой нейтрализующее антитело против GITRL.

Пример 14

Блокирование связывания GITR-GITRL антителом против GITRL предоставляет адаптивный перенос индуцированного PLP экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита

Самок мышей SJL в возрасте девяти недель иммунизировали 150 мкг пептида PLP (аминокислоты 139-151) [HSLGKWLGHDPKF (SEQ ID NO:12)] в полном адъюванте Фрейнда. Через десять суток после иммунизации клетки селезенки собирали и повторно стимулировали ex vivo в течение 3 суток 10 мкг/мл PLP (аминокислоты 139-151) в отсутствие (без обработки) или в присутствии 10 мкг/мл антитела (антитело против GITRL или контрольное антитело). После повторной стимуляции 5×10⁶ клеток селезенки адаптивно переносили наивным SJL мышам в возрасте 10 недель и затем мышей подвергали мониторингу в течение 52 суток на предмет экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ), измеряемого по шкале от 0 до 5. ЕАЕ развивался у 40% мышей, которые получали клетки селезенки, повторно стимулированные в отсутствие каких-либо антител (без обработки), и у 80% мышей, которые получали клетки селезенки, повторно стимулированные в присутствии контрольного антитела (СК01) (фиг.14). Кроме того, не было существенных различий по шкале заболевания между животными, которые получали клетки селезенки без обработки, и животными, которые получали клетки селезенки, обработанные контрольным антителом. Значимо то, что ни у одной мыши, которые получали клетки селезенки, которые повторно стимулировали в присутствии антитела против GITRL (5F1), не развивался ЕАЕ (p=0,0023 по отношению к обработке контрольным антителом) (фиг.14). Эти данные указывают на то, что блокада пути GITR/GITRL ограничивает способность CD25⁺ Т-клеток преодолевать супрессию с отрицательным модулированием их способности осуществлять аутоиммунные реакции.

Пример 15

Экспериментальные методики

Пример 15.1. Антитела и реагенты

Все антитела, использованные для проточной цитометрии или функциональных исследований, были от BD-Pharmingen, кроме: меченного тремя цветами aCD4 (клон CT-CD4) и aB220 (клон RA3-6B2), которые приобретали у Caltag (Burlingame, Калифорния),
 5 и MGTL-10, MGTL-15 и поликлональные антитела против GITRL, которые приобретали у Alexis Biochemicals (Сан-Диего, Калифорния). Очищенные F(ab')₂-фрагменты антител козы против μ -цепи IgM приобретали у Jackson Immunoresearch (West Grove, Пенсильвания). Анти-IL-2 (клон S4B6) использовали в
 10 виде асцитной жидкости. Человеческий рекомбинантный IL-2 получали из National Cancer Institute (Frederick, Мэриленд). IL-4, IFN- γ , IL-12 и колонки для обогащения Т-клеток приобретали у R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота). Poly-I:C и ЛПС приобретали от Sigma. CpG приобретали от InvivoGen (Сан-Диего, Калифорния).
 15 Анти-GITRL (клон 5F1; также клон 10F12) и анти-GITR (клон DTA-1) и пептид PLP продуцировали в собственной лаборатории. Магнитные гранулы против B220, CD11c, CD11b, CD8, CD4 и PE приобретали у Miltenyi (Auburn, Калифорния).

Пример 15.2. Мыши

Мышей BALB/c и C57B1/6 (самки в возрасте 6-8 недель) приобретали от вивария NCI
 20 Frederick (Frederick, Мэриленд). Мыши *CD28*^{-/-} предоставлены д-ром Alfred Singer (NIH/NCI). *GITR*^{+/-} эмбрионы (Sv129xB6) предоставлены С. Ricarrdi (Perugia University Medical School, Италия) (Ronchetti et al., 2002). Происходящих от них *GITR*^{+/-} мышей подвергали обратному скрещиванию с мышами C57BL/6 и полученное потомство
 25 подвергали скринингу на мутантную аллель посредством ПЦР. Идентифицированное потомство *GITR*^{+/-} затем скрещивали путем инбридинга с получением *GITR*^{-/-} мышей. Всех мышей разводили и содержали на фабриках NIH/NIAID в SPF (лишенных специфичных патогенных микроорганизмов) условиях.

Пример 15.3. Клонирование и экспрессия кДНК

Аминокислотную последовательность человеческого GITRL (инвентарный № GenBank NM_005092) использовали для поиска в базе данных Celera на
 30 предмет mGITRL. Геномная последовательность ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2 содержала три области пар с высоким счетом (HSP). Основываясь на допущении, что
 35 данные области соответствуют экзонам мышинного GITRL, конструировали для ПЦР-амплификации. С прямым праймером (5'-ATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG-3') (SEQ ID NO:4) и обратным праймером (5'-GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG-3') (SEQ ID NO:5) амплифицировали клон кДНК из тимусной библиотеки мыши.
 40 Полученный в результате фрагмент субклонировали и определяли последовательность ДНК. Последующий полноразмерный клон амплифицировали посредством ПЦР из предыдущей конструкции с использованием праймеров 5'-TTTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG-3' (прямой) (SEQ ID NO:6) и 5'-TTTAAAGAATTCTCATTAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT-3' (обратный) (SEQ
 45 ID NO:7). Полученный в результате фрагмент ПЦР субклонировали в ретровирусный вектор GFP-RV (Ouyang et al., 1998) и проводили определение последовательности конечного клона кДНК. Затем данный вектор трансфицировали в клеточную линию Phoenix. Образцы надосадочной жидкости из трансфицированных
 50 клеток Phoenix использовали для трансдукции клеточной линии YB2/0. Экспрессирующие GFP клетки YB2/0 затем сортировали на FACS и сохраняли в культуре. Предсказанная аминокислотная последовательность mGITRL была идентична таковой, полученной в другой группе (Kim et al., 2003), за исключением

замены аланина валином в аминокислотном положении 48 их последовательности.

Пример 15.4. Продукция и очистка моноклональных антител

Крыс Lewis иммунизировали один раз $s.q.$ 100×10^6 клеток YB2/0-GITRL в CFA. Через две недели данных крыс иммунизировали $s.q.$ 100×10^6 клеток YB2/0-GITRL в IFA. Через две недели крыс стимулировали 50×10^6 клеток YB2/0-GITRL в PBS. Через четверо суток получали селезенку и проводили слияние клеток, как описано ранее (Coligan et al., 2003). Образцы надосадочной жидкости из полученных в результате гибридом подвергали скринингу путем проточной цитометрии с использованием клеток Phoenix-GITRL и Phoenix. Антитела очищали из образцов клеточной культуральной надосадочной жидкости с использованием загруженных белком G колонок и элюированные антитела диализовали против PBS.

Пример 15.5. Очистка клеток

Т-клетки очищали из периферических лимфоузлов мышей. $CD25^+$ Т-клетки метили магнитными гранулами и очищали на autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, Калифорния) по протоколу производителя. Чистота $CD25^+$ клеток обычно составляла от 97 до 99 процентов. Клетки, оставшиеся в негативной фракции, впоследствии метили микрогранулами против CD4 или против CD8 и очищали с использованием метода позитивной селекции на autoMACS. Чистота рутинно составляла 90-95 процентов. Истощенные по Т-клеткам суспензии селезенки получали из суспензий с лизированными эритроцитами путем истощения $Thy1.2^+$ клеток с использованием autoMACS. Клетки B220+ очищали из спленоцитов сходным образом с использованием микрогранул против B220 (Miltenyi Biotech, Auburn, Калифорния), и чистота полученных в результате препаратов составляла более 90%. Перитонеальные клетки получали путем промывки полости брюшины (PerC) 10 мл холодного HBSS. Для получения DC селезенки суспензии клеток селезенки подготавливали способом, аналогичным описанному (Vremes et al., 2000). Затем DC селезенки очищали от суспензий с использованием микрогранул против CD11c (Miltenyi Biotech, Auburn, Калифорния). Полученные в результате суспензии DC были обычно 85-90-процентной чистоты. $CD4^+CD25^-$ клетки крысы получали истощением $CD25^+$ клеток селезенки крысы с использованием PE-антител против крысиного CD25 (OX-39) с последующим применением микрогранул против PE. После истощения $CD4^+$ клетки затем отбирали из истощенной фракции с использованием микрогранул против крысиного CD4.

Пример 15.6. Анализы пролиферации in vitro

Анализы супрессии проводили, как описано (Thornton and Shevach, 1998). В кратком изложении (5×10^4) клетки совместно культивировали в дополненной FBS RPMI 1640 (Atlanta Biologicals, Atlanta, Джорджия) с облученными (3000 R), истощенными по Т-клеткам клетками селезенки (5×10^4) в присутствии 0,5 мкг/мл mAb против CD3 (2C11) в 96-луночном плоскодонном планшете. К некоторым культурам добавляли антитела, специфичные в отношении GITR, или крысиные Ig против изотипа добавляли до конечной концентрации 2 мкг/мл. Титрованные количества $CD4^+CD25^+$ клеток добавляли в конечном отношении супрессора к отвечающей клетке, равных 0:1, 1:2, 1:4 или 1:8. Культуры подвергали действию 1 мКи 3H -тимидина в течение конечных 5-8 часов 72-часового культивирования и проводили эксперимент в трех параллелях, кроме указанных иначе случаев. Совместные культуры крысиных и мышинных субпопуляций Т-клеток были установлены сходным образом, за исключением того, что облученные (3000 R), истощенные по CD4 клетки селезенки крысы использовали в качестве APC, и крысиные и мышинные Т-клетки стимулировали с использованием

коктейля mAb против крысиного CD3 (0,25 мкг/мл) и против мышиноного CD3 (0,25 мкг/мл).

Пример 15.7. Культивирование *in vitro* клеток лимфоузла и мечение CFSE

Истощенные по CD25⁺ суспензии клеток лимфоузла получали на autoMACS, как описано выше. Клетки метили CFSE в концентрации 2 мкМ в течение 8 минут на водяной бане с температурой 37°C. Клетки затем промывали в полной RPMI 1640. Клетки (5×10⁴/лунка) затем культивировали в 96-луночных планшетах в присутствии или в отсутствие rhIL-2 (50 ед./мл). Параллельные лунки или обрабатывали 1 мкКи ³H-тимидина в течение конечных 5-8 часов 72-часового культивирования или использовали для анализа разведения CFSE.

Пример 16

Обсуждение

Предположение о роли GITR в функционировании CD4⁺CD25⁺ Т-клеток возникало из демонстрации того, что поликлональные и моноклональные антитела против GITR отменяли супрессорные эффекты CD4⁺CD25⁺ Т-клеток при добавлении к совместным культурам CD25⁺ и CD25⁻ Т-клеток (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002).

CD4⁺CD25⁺ Т-клетки оказались наиболее вероятной мишенью реагентов против GITR, поскольку CD25⁺ Т-клетки в свежей культуре экспрессировали GITR на более высоком уровне, чем покоящиеся CD25⁻ Т-клетки, и поскольку антитела против GITR вместе с IL-2 препятствовали пролиферации CD25⁺, но не CD25⁻ Т-клеток в отсутствие сигнала TCR. Более того, когда Shimizu et al добавляли крысиное mAb против mGITR, которое не взаимодействовало с клетками крысы, к совместным культурам мышинных CD25⁺ супрессоров и отвечающих крысиных Т-клеток, наблюдалась отмена супрессии. Данные исследования привели к гипотезе, что вовлечение GITR посредством агонистических антител против GITR и, предположительно, его физиологического лиганда генерировало сигнал, который ингибировал супрессорную активность CD4⁺CD25⁺ Т-клеток и отменял неспособность к ответу CD25⁺ Т-клеток на экзогенный IL-2.

Планировали эксперименты, в которых пытались расширить и подтвердить данные исследования путем клонирования мышиноного GITRL, анализа его распределения в ткани и окончательно определения мишени агонистических антител против GITR с использованием смесей CD25⁺ и CD25⁻ Т-клеток из мышей дикого типа и мышей *GITR*^{-/-}. Все вместе данные исследования демонстрируют, что антитела против GITR и GITRL препятствуют супрессорным эффектам CD4⁺CD25⁺ Т-клеток путем предоставления CD25⁻ Т-клеткам уникального сигнала, повышающего их барьер для подавления CD4⁺CD25⁺ Т-клетками. Данные исследования показывают, что GITRL избирательно экспрессируется на клеточной поверхности APC при наиболее высоком уровне экспрессии на В-1 В-лимфоцитах; при промежуточных уровнях на обычных В-2 В-лимфоцитах, макрофагах и В220⁺ DC; и при низких уровнях на субпопуляциях В220⁻ DC. GITRL уникален среди представителей надсемейства TNF в том, что он экспрессируется на покоящихся APC, и его экспрессия отрицательно регулируется путем включения В-клеточного рецептора CD40 или различных Toll-подобных рецепторов. Другие представители надсемейства TNF (4-1BB-L, OX40-L, LIGHT, CD70, CD30-L) не выявляются на покоящихся APC, и их экспрессия положительно регулируется путем активации APC через стимуляцию Toll-подобных рецепторов (Croft, 2003). В настоящих исследованиях не установлено, сопровождается

ли отрицательная регуляция экспрессии GITRL на клеточной поверхности секретацией растворимого GITRL, но Tone et al. (2003) сообщили, что стимуляция ЛПС DC, макрофагов и В-клеток приводит к отрицательной регуляции мРНК GITRL.

Экспрессия GITRL на покоящихся APC заметно указывает на то, что он функционирует на ранних этапах процесса активации Т-клеток. Также была показана экспрессия GITRL на других клеточных типах, включая эндотелиальные клетки (Gurney et al., 1999; Kwon et al., 1999), активированные Т-клетки и некоторые субпопуляции тимоцитов DN, и функция данной молекулы на этих более поздних клеточных типах еще подлежит определению.

Способность антител против GITR и экспрессирующих GITRL клеток усиливать активацию CD25⁻ Т-клеток отдельно, а также способность анти-GITRL частично ингибировать активацию CD25⁻ Т-клеток в отсутствие CD25⁺ Т-клеток потребовала тщательной повторной оценки клеточной(ых) мишени(ей) данных реагентов. Добавление анти-GITR в совместные культуры CD25⁺ и CD25⁻ Т-клеток из мышей дикого типа и мышей *GITR*^{-/-} продемонстрировало, что мишенью для опосредованной антителом отмены супрессии являлась CD25⁻ Т-клетка. Это далее подтверждалось экспериментами с использованием крысиных CD25⁻ отвечающих клеток и мышинных CD25⁺ супрессорных Т-клеток в совместных культурах, которое решительно демонстрировало, что нефункциональное связывание GITR на субпопуляции CD25⁺ Т-клеток не отменяет их супрессорной функции. Фактически оценка разведения CFSE демонстрирует, что нефункциональное связывание GITR способствует экспансии CD25⁺ Т-клеток в совместных культурах, что окончательно усиливает супрессию крысиных CD25⁻ отвечающих клеток. Поэтому возможно, что усиление пролиферации обработанных анти-GITR крысиных/мышинных совместных культур, о котором сообщалось Shimizu et al. (2002) и которое предполагалось следствием действия крысиных Т-клеток, в действительности отражает пролиферацию мышинных CD25⁺ супрессорных клеток. Прояснить это не могло одно лишь измерение включения ³H-тимидина.

В одном из предшествующих отчетов предполагалось, что дефицитные по GITR Т-клетки гиперреактивны в отношении стимуляции TCR (Ronchetti et al., 2002). Однако экстраполяция данных наблюдений на настоящие наблюдения затруднена, поскольку в том отчете не анализировались реакции очищенных CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов и не оценивалась роль CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. В настоящих исследованиях реакции высокоочищенных CD4⁺CD25⁻ и CD8⁺ Т-клеток из мышей *GITR*^{-/-} были сравнимыми с таковыми в контроле. Однако в присутствии физиологических количеств регуляторных Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки из *GITR*^{-/-} животных полностью не отвечали на перекрестное связывание с CD3. Данный результат четко демонстрирует, что в отсутствие взаимодействий GITR/GITRL супрессия является доминантной. Действительно, супрессия активации CD4⁺CD25⁻ Т-клеток из *GITR*^{-/-} мышей была так сильна, что ее не могли преодолеть добавлением высоких концентраций экзогенного IL-2, который обычно отменяет супрессорные эффекты больших количеств CD25⁺ Т-клеток в отношении ответа CD4⁺CD25⁻ Т-клеток дикого типа (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Супрессорные эффекты CD4⁺CD25⁺ были опосредованы ингибированием продукции IL-2 и экспрессией CD25 популяцией отвечающих клеток CD4⁺CD25⁻ *GITR*^{-/-}, что напоминало явление, ранее

описанное для эффектов $CD4^+CD25^+$ Т-клеток на нормальные реакции $CD8^+$ Т-клеток (Piccirillo and Shevach, 2001).

Костимуляторные сигналы, доставляемые GITR и CD28, оказались различными, но взаимосвязанными. В отсутствие регуляторных Т-клеток реакции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток из $GITR^{-/-}$ мышей были идентичными реакциям клеток из мышей дикого типа. Наоборот, при условиях культивирования, используемых в данном исследовании, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки из $CD28^{-/-}$ мышей не реагировали. В отличие от этого, когда к культурам, содержащим регуляторные Т-клетки, добавляли IL-2, реакции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток из $GITR^{-/-}$ мышей не восстанавливались, в то время как реакции $CD8^+$ клеток из $CD28^{-/-}$ мышей частично восстанавливались. С другой стороны, потенциальные кооперативные взаимоотношения и взаимная иерархия в передаче сигнала между CD28 и GITR подтверждались демонстрацией того, что (1) $CD4^+CD25^-$ и $CD8$ Т-клетки не могли положительно регулировать GITR в отсутствие перекрестного связывания CD28, и (2) антитела против CD80/CD86 заметно ингибировали положительную регуляцию экспрессии GITR и способность реагировать на антитела против GITR. Таким образом, данные результаты указывают на то, что важная дополнительная функция передачи сигнала CD28-CD80/CD86 во время активации Т-клеток представляет собой допущение устойчивости Т-клеток к опосредованной $CD25^+$ супрессии путем усиления экспрессии и функции GITR.

Сходно с результатами, предложенными в других опубликованных исследованиях (Shimizu et al., 2002; Tone et al., 2003), данные исследования указывают на то, что нефункциональное связывание GITR на $CD25^-$ Т-клетках в отсутствие регуляторных Т-клеток предоставляет некоторую степень совместной стимуляции. Однако нефункциональное связывание GITR не требуется для костимуляции $CD25^-$ Т-клеток, как для CD28, поскольку $CD4^+CD25^-$ и $CD8$ Т-клетки из $GITR^{-/-}$ мышей отвечали одинаково с Т-клетками дикого типа. Авторам изобретения удалось наблюдать, что вовлечение GITR на $CD4^+CD25^-$ и $CD8^+$ эффекторных Т-клетках посредством GITRL на ранних этапах иммунного ответа служит главным образом для того, чтобы сделать популяцию эффекторов устойчивой, например менее чувствительной, к супрессорным эффектам $CD4^+CD25^+$ Т-клеток. В ходе ответа воспалительные сигналы, в конечном счете, приводят к отрицательной регуляции экспрессии GITRL, с повышением таким образом, чувствительности эффекторных клеток к опосредованной $CD25^+$ супрессии. Хотя имеются только ограниченные данные, касающиеся опосредованной $CD25^+$ супрессии иммунных реакций на инфекционные агенты *in vivo*, некоторые исследования указывают на то, что она действует в фазе ограничения, а не инициации ответа для предотвращения повреждения тканей, вторичного по отношению к избыточному воспалению (Suvas et al., 2003). Следует подчеркнуть, что вовлечение GITR на $CD25^+$ Т-клетках в присутствии IL-2 индуцирует их экспансию (McHugh et al., 2002). Остается возможность того, что вовлечение GITR $CD25^+$ Т-клетках за счет GITRL на покоящихся APC *in vivo* приводит к неспецифической экспансии регуляторных Т-клеток в присутствии IL-2, секретируемого эффекторными Т-клетками на ранних этапах иммунного ответа. Данная неспецифическая экспансия может быть критической для последующего образования объединенной группы антигенспецифичных супрессорных клеток, которые функционируют в плане ингибирования эффекторной клеточной активности на более поздних этапах ответа.

Авторы изобретения ранее предположили, что манипуляция с взаимодействиями GITR/GITRL может оказаться эффективным путем манипуляции функцией регуляторных Т-клеток *in vivo* (McHugh and Shevach, 2002). Хотя данная концепция была основана на том, что мишенью антитела против GITR является CD4⁺CD25⁺ Т-клетка, по-прежнему имеется представление, что взаимодействие GITR/GITRL представляет важную терапевтическую мишень. Таким образом, обработка агонистическим антителом против GITR или агонистическим GITRL-Fc должна сделать эффекторные клетки устойчивыми, например, менее чувствительными к супрессорным эффектам CD4⁺CD25⁺ Т-клеток и должна оказаться эффективной для лечения злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний, для усиления иммунных реакций на злокачественные опухоли (в применении отдельно или в комбинации с другими противоопухолевыми способами лечения, например с противоопухолевыми вакцинами) и для усиления иммунных реакций на инфекционные патологические микроорганизмы, включая вирусы, бактерии и т.д. (в применении отдельно или в комбинации с другими способами лечения от инфекционных патологических микроорганизмов, например, с вакцинными адъювантами для ослабления вакцин против инфекционных агентов). Аналогично, ингибирование взаимодействий GITR/GITRL агонистом GITR, например посредством нейтрализующего антитела против GITRL или GITR-Fc, должно снизить порог эффекторных Т-клеток к супрессии и, таким образом, может быть полезно для профилактики и/или лечения аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний, отторжения трансплантата (или пересаженного органа или ткани) и болезни трансплантат против хозяина.

Ссылки

Следующие ссылки являются полными цитируемыми ссылками с указанием автора и года, встречающихся в описании:

Aseffa, A., Gummy, A., Launois, P., MacDonald, H.R., Louis, J.A., and Tacchini-Cottier, F. (2002). The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol* 169, 3232-3241.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Balked, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. (2002). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

Coligan, J.E., Frisbee, A.M., Argufies, D.H., Shevach, E.M., and Strobe, W., eds. (2003). *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc.).

Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3, 609-620.

Depper, J.M., Leonard, W.J., Dracula, C., Crone, M., Walkman, T.A., and Greene, W.C. (1985). Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4230-4234.

Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negro, E., Gallegos, A., and Rudenski, A. (2002). Homeostasis and energy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells *in vivo*. *Nat Immunol* 3, 33-41.

Gilfillan, M.C., Noel, P.J., Paddock, E.R., Rainer, S.L., and Thompson, C.B. (1998).

Expression of the co stimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 160, 2180-2187.

Godfrey, D.L., Kennedy, J., Soda, T., and Slotting, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypic ally and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative

adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.

Gurney, A.L., Marsters, S.A., Huang, R.M., Pitti, R.M., Mark, D.T., Baldwin, D.T., Gray, A.M., Dowd, A.D., Brush, A.D., Heldens, A.D, *et al.* (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol* 9, 215-218.

Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S., and Yasutomo, K. (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nat Med* 10, 29-30.

Kim, J.D., Choi, B.K., Bae, J.S., Lee, U.H., Han, I.S., Lee, H.W., Youn, B.S., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2003). Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun* 4, 564-569.

Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S.H., and Mittucker, H.W. (2002). Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196, 1585-1592.

Kwon, B., Yu, K.Y., Ni, J., Yu, G.L., Jang, I.K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S.X., and Kwon, B.S. (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 274, 6056-6061.

Lundgren, A., Sim-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A.M., and Lundin, B.S. (2003). *Helicobacter pylori*-specific CD4+ CD25 high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect Immun* 71, 1755-1762.

Malek, T.R., and Ashwell, J.D. (1985). Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone. *J Exp Med* 161, 1575-1580.

Maloy, K.J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N.J., and Powrie, F. (2003). CD4+ CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197, 111-119.

McHugh, R.S., and Shevach, E.M. (2002). The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 110, 693-702.

McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., and Byrne, M.C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.

Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M.D. (2001). CD1 1c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171-1178.

Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C., and Murphy, K.M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745-755.

Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-1140.

Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.

Ronchetti, S., Nocentini, G., Riccardi, C., and Pandolfi, P.P. (2002). Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 100, 350-352.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat*

Immunol 3, 135-142.

Suvas, S., Kumaraguri, U., Pack, C.D., Lee, S., and Rouse, B.T. (2003). CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198, 889-901.

5 Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state, *Int Immunol* 10, 1969-1980.

10 Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296.

15 Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S.P., Frewin, M.R., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15059-15064.

20 Uraushihara, K., Kanai, T., Ko, K., Totsuka, T., Makita, S., Iiyama, R., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2003). Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25-CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 708-716.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.

25 Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.

30 Yu, K.Y., Kim, H.S., Song, S.Y., Min, S.S., Jeong, J.J., and Youn, B.S. (2003). Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 433-438.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5

<110> Wyeth
 The Government of the United States of America as
 represented by the Secretary of the Department of Health and Human
 Services
 Collins, Mary
 Shevach, Ethan M.
 McHugh, Rebecca S.
 Whitters, Matthew J.
 Young, Deborah A.
 Byrne, Michael C.
 Reddy, Padmalatha F.
 Stephens, Geoffrey L.
 Carreno, Beatriz M.

10

15

<120> Лиганд GITR и связанные с лигандом GITR молекулы и антитела и варианты их применения

<130> 01997.028500

20

<150> US 60/472,844

<151> 2003-05-23

<150> US 60/547,975

<151> 2004-02-26

25

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 522

<212>

30

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(522)

35

<400> 1

atg gag gaa atg cct ttg aga gag tca agt cct caa agg gca gag agg 48
 Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg
 1 5 10 15

tgc aag aag tca tgg ctc ttg tgc ata gtg gct ctg tta ctg atg ctg 96
 Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu
 20 25 30

40

ctc tgt tct ttg ggt aca ctg atc tat act tca ctc aag cca act gcc 144
 Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala
 35 40 45

45

atc gag tcc tgc atg gtt aag ttt gaa cta tca tcc tca aaa tgg cac 192
 Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Ser Lys Trp His
 50 55 60

atg aca tct ccc aaa cct cac tgt gtg aat acg aca tct gat ggg aag 240
 Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys
 65 70 75 80

50

ctg aag ata ctg cag agt ggc aca tat tta atc tac ggc caa gtg att 288

Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile
 85 90 95
 cct gtg gat aag aaa tac ata aaa gac aat gcc ccc ttc gta gta cag 336
 Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln
 100 105 110
 5 ata tat aaa aag aat gat gtc cta caa act cta atg aat gat ttt caa 384
 Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln
 115 120 125
 10 atc ttg cct ata gga ggg gtt tat gaa ctg cat gct gga gat aac ata 432
 Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile
 130 135 140
 tat ctg aag ttc aac tct aaa gac cat att cag aaa aat aac aca tac 480
 Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr
 145 150 155 160
 15 tgg ggg atc atc tta atg cct gat cta cca ttc atc tct taa 522
 Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser
 165 170
 <210> 2
 <211> 173
 20 <212> Бeлoк
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg
 1 5 10 15
 25 Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu
 20 25 30
 30 Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala
 35 40 45
 Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Ser Lys Trp His
 50 55 60
 35 Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys
 65 70 75 80
 40 Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile
 85 90 95
 Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln
 100 105 110
 45 Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln
 115 120 125
 50

Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile
130 135 140

5 Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr
145 150 155 160

Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser
165 170

10 <210> 3
<211> 10289
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 3
tcaggagaca gctataccag gctcctagct gcaagcactc acaaaccaca tgaaactcaa 60
15 aaagtaagac caaagtgtgg atgcttcaat ccttcctaga aggggtgaaca aaatacccat 120
ggaccaaagg aaaactccac ctctacacc cacggggcta attactataa aacatgacat 180
tgcatcgttc atccatcact tgtgggtatc tgctttcccc agttctcatt ccatcagaga 240
20 acgagttcta gcctcatgga ggaaatgcct ttgagagagt caagtcctca aagggcagag 300
aggtgcaaga agtcatggct cttgtgcata gtggctctgt tactgatgct gctctgttct 360
ttgggtacac tgatctatac ttcactcaag gtaaggtggc catagagtct acagctgcta 420
attatatcat ataaaggtta tttatttggt agtctgggta ttatcactgc cattcagcat 480
25 tgctagaggt agtgggaagg aagacatttg acagtacaaa cagtgtaagc aatttaagcc 540
ttgtaatgac atggctcttc aaatgtgttt ttattcatcg aatgttttaa gacaaaagac 600
actagaaaat actatatatt ctctgtaggt gtgagctaga tagaactaca tgtttaaact 660
30 gagccttttag gtgtctgtgg aagttctttt gtccttcctg ggactctact agaaccttct 720
tgattggcaa agaaaagacc tgaaccatgg tactaatctt cgggtaacc cagacaagct 780
gtagtctcat tgggggaaga gatacaaac agtaatgggg gacagtgaca ggaagcaact 840
gcattgctgag gaagggcatg gtgtcaaagt agaaaaaag gaaatcctgg gttccagttc 900
35 tagattagcc tccccataac cagctgtgca aatttgagta agttgtatcg ttgttctgat 960
tctagttttt aggtctgcaa catgggtgata agggaatggc tctgtttact tggcatcctg 1020
ctagctgtaa ttatagcgcg cagtaattga ctaggagaa ggataaacca tatagttgtg 1080
40 gtttatgagg ggaataactt tgggcttggg tgaccagga aggcttcatg gaggaggag 1140
gagcacatgt ctgtttggga agcccctgat ggttatcagg aatttcccat tgaactctag 1200
tgtaaatgtt gggcttagat gggatatgaa ctggaaatgt atatcaatta ggtttttcta 1260
45 gaagtgttct ctcatacaga acagccaggg ctgcagagag agagagagag aaaaaaaac 1320
agcaaaaacc aaacaaaaac aaacagacaa aaaaaaaaaa aaacaacaaa acaaaaacaa 1380

50

acaaaaaaaaaa ccaaaaaaag cattgaccag aaaagccaga aaggaatcaa atattaaata 1440
 agacattata taattcaagg gttggcctat ttatattaaa atatactaaa tcttgggcag 1500
 aattaaatga cgcatagctg tgtaagaaag ggttgtgatg tgagcccagg aacatttttc 1560
 5 taaagagacc aaaccagagat ggtcttaaag gtatggttct atattggcaa gatattgaga 1620
 aaagatgcag gaggaagtaa tgcactgttg attcgagggtt acttagtatg gtactggcta 1680
 aagacttaca taggagccca ttaatctgta gtctgtaact gtacaaatgg atcaaaggca 1740
 10 gaggggagttc taaccccagc cccacccttc caaagaatga accaagacac gaactttctg 1800
 aagcaatgag tggtgagagg actctcagca ttctcaaggg tttaaaggag gaaggctgag 1860
 gatgcattaa gttcacactg aaagggcttt ttctcaggc aaacttcctc aagtcttatt 1920
 aatcaggttg ctctgagcat cagtgaagtct aggtgccgct gactcctggt ggtgaggagt 1980
 15 ggccgaggga aatgcctttc cgagtgacat ctctccac aatcaaacct tggttaattca 2040
 tgattgctga aactttgatt ccagggttggc ctctcaaaag aacacatccc tttcaatgaa 2100
 gggttcctct tctaaacgta aaagttatcc caaatttaag gaagtaaaaa gttttggagt 2160
 20 ctcttttctc gtcaggatgc ttggcagcgt agttactatg gaaacgacac tggctttcag 2220
 ggtagcttc agtattacac ttcccttatt ggctacaaat aaatgtcttg agcagagaga 2280
 tctgagtggc tggcaggtgc tgagttattg tgaggtgggt gcttccacct tttcatactt 2340
 aagaacttag aagttttttt tttctttctt ttttgatgca aatctccatt tttaaaagtc 2400
 25 tcttctaaaa aaagaagact tccctctttt tttttttttt ttttataaat aaccctctta 2460
 tgtttaaaag taagatatga agcttgggtt ctttcagatt tttttttctc tctatctcct 2520
 aggagacatc tagttaagag actagactgg agctcaaggc ggttggccaa ctctccatg 2580
 30 aaagcagctc acaaaagttt tctctgaagc atccaaatag tcaggaaagt ccctttcttc 2640
 agtgaggaag ggtggaattc cagaaggga aatggaattt gtacaattgt acttgcaaac 2700
 agacggagta gattttcttt ccaaacatat gaggttagga ttagcctgga gtctgccttg 2760
 gtcattctga gacaaaacaa gtcaatctgg tcttcaacca aagtgagggtt agaagaccaa 2820
 35 ctgaccttc taaataaaag caaaactaga gtaaaactgaa agctttgtat gtagcttttc 2880
 gtaacatcaa ttgaattata aatagaaact gcccagtgta gtcgtagggg tgagagagag 2940
 agagagagag agagagtttt gaataagagt ctggttgagg atgccagcct ttcttatcag 3000
 40 ccatatgacc ttgggcttat tacttcatca ccgtgctctc atttctcat ctgcagaagg 3060
 aacgtggtaa ttcttacaga gttgccttaa ggaataagga ggcagtaatg tgcctgaccc 3120
 tcctgactca tgctaggctc tagatggctg tgattaatat ttatgccacg gttacttata 3180
 45 aggtttacaa tgaatacaaa caacaaggtc atttaaaata tacatggctt gtctgacctc 3240

50

ccttcctcag taaaagacct cttctctcaa ccaaaatgat aattttccaa ttatatttta 3300
 acttatggca atagttatgg atgaactcag tggcattttc taactctaaa tagatattaa 3360
 agccactcga aataggcttt ctggatgctt ttctctgtca gttcatttgt ctattgattt 3420
 5 agattttctg tgtacttctt acacatggtg atagctggaa caaaatccaa gacatttgta 3480
 ttttgctggc tacttaattg cttcctatgt atgatcatgt cagtctagct agattacaaa 3540
 cttcctgaga gataacaatt gtacattaaa tgtgtctttc ttgcttagaa tgctagtata 3600
 10 atgttgggac tataggtaat taagttgttt atttaacttg tttttataat cagcatcatt 3660
 atcaaaatag ctgatattta ctgagaagct tcaggtagcc tgtctggaga aaccctctcc 3720
 aagaatcaga gtggtaaagt aagaacaaac ggtttagtga ttccccgctc ttactccctg 3780
 cttaatagat aaggaaattg gaattctgga agccccctgc ataaccttgt cagtctttgt 3840
 15 gctgaactga ctttggacat ctcttttaag aaaacccaaa atgtggatga aataattgca 3900
 agagtagagt gggtttcagg aaatccagtg tcttttagtt tttagagtca tggcttctcc 3960
 ccttttttat tgcaccgctt tattggtata aaatgctctt attataactt ctaacatatg 4020
 20 tatactagat agtatctcac gtctgagtat aaaaccatgt acacaaaaga tgtgtacaca 4080
 cacaagatgg aaagtctaaa agtttaatac agattttccc gtctaagtct attttgcttt 4140
 agttaagttg ttaagttgtc tataatatat taacattgat gcaaacataa tacagtaatt 4200
 gaaatattgt ttctttggtg ctgatctctt agtcacattc agagccctag tgatttgata 4260
 25 ttatttgttt tatttcctta attttagctt aacattttat aatacagtaa cttgagattt 4320
 atattctaatt ttatcttgat ttatgatttt gactgtacca attgaaaatt accttcttgg 4380
 acttgatgtt cacatataat ttcatgtcta aaagcaatga atcttggcat catatatcta 4440
 30 actacctact tgatatctaa taagcaacac aaaccacac cttcaaaagt tgtcatgggt 4500
 cccctcttac tttctttcta ttagtctttc gaatttgggt aattaactta atttttttca 4560
 atgactgcag tcccaaatct tggagttatc tttcttttat tgcattgcct catgctagta 4620
 ttcatgtcag gaactccagt tacttcttgc ttccttctcc atatagccta gcttgatctg 4680
 35 aaagtcacag ttctcctgct tcaacctaaag tgctattaag acaggcgtgc atctctctgt 4740
 tggaccctct gccagcacct tggtcagagc catgtgcttt ccagtttata gactccatcc 4800
 agtccatgcc taactgactt cattgctttt accttctggt ctctttgttt tttttttttt 4860
 40 cctagcataa tagctggaaa aatcctttaa aaggatcata gatcagtctc catgcttaaa 4920
 aaaagtcttt tgagcacttt gctcccagga aaccaatgca ttctcagtac ccaaaacttt 4980
 aatgtttggg ccttattttt aaccctgaag catttaacag catttaagtg attgtatttg 5040
 45 taaattagcc ataattaatg ttacctttca gcatgtcgca gacattttga aacacttggt 5100
 tctgattctg aaggcattcc atttattata catggcctgt gatttttcta tacattaaat 5160

50

atttctggag ctaatgctgt tgttttaagt aaagggaaaa caaagataag cagaggtccc 5220
 attatttttc ccacatgcaa cagatcatct tgggaaatga ttgatgggga tatggagact 5280
 gctgtttgta gtgaactaga gaggaagaac ccagcttcat cacttgccctt gtgtgtcaaa 5340
 5 ggaaaacgaa caggatgaga caccaaagtc ttggataaaa gacaccctcc aaaaagatct 5400
 gctacctttc ttctcatgat taaatctatc attccatgac accattttta aaattaaaac 5460
 aatgctgctc accaccctta ttcatgcttt ctttcccttt ttaagattta tttattatat 5520
 10 gtatgtacac tgtagcaatc ttcagacgct ccagaagaag gcgtcagagc tcggtataga 5580
 tggttgtgag ccaccaggta gttgctggga tttgaactca ggacctttgg aagagcattc 5640
 agtgctctta actgctgaac catctttgct gccctctctt catgctttct tttgtctctg 5700
 tatacagcta aattcgtgtg tctaataatc ctctgccac acatccttat tcacttgctt 5760
 15 cctcatgtct tcctaaaact ctcatgtaag tcaaatgtaa aggacagaac cagtcactctg 5820
 tagagggaaa tgaagaagta tgtcaggtgt acagggtgtct gtgtttgtgt gttgggagga 5880
 ggggcatatt ttcgggaggg gtttgggggg tggaaaatag tttgcttcag aaactttaaa 5940
 20 ctctaagtaa ttagtcaagc atgtagcagt ggtgccatca ttctgaccag ttcttctttt 6000
 ccttcaacag ccaactgcca tcgagtcctg catggttaag tttggtgagt aacccatctc 6060
 ccatggtttc ctttcatttt ccttagattc tgaggcaaga aggccagtgc cagtgccctc 6120
 ggaaagcccg tgcacctttt agttcacttt cagtgattgt ttattacaat tactcacccc 6180
 25 atacttgctg tctgccaggt gagaactgag gctccagggc tgagcccgat tgacaagccc 6240
 acaccagggtg acactcttgg caggcataga catccacta acaagagcct tgtggatctg 6300
 catacagcaa tcagctttta gtttggtagt ttattaagga tatttttcag attcctacaa 6360
 30 ccttttgtca gagcatttct tatatttcat acatgtctag tgtctagtag agcatatggg 6420
 aaccattact gctgttagta agtgcagaga agagaaggaa gaagcgcttc ctctttgctt 6480
 ctgagtcact tttcgtgaca gtcacctgat attcgctcag aaaacatgga aaacagtgct 6540
 gctgagtgtt ttagtttcat ttctgttgct tttataagat accctgtcaa aaaacaactt 6600
 35 ttggagaaaa aggatttgtt ttattcacia gtgcaaatta tagtcctca accgtggaga 6660
 aatcatggcc acaggagttt gaagcatcta gtcacattca gtcaagagca gaggaaaacg 6720
 aagtgcactt gcttattgct tgcttttttt taattggata ttttatttat ttacatttca 6780
 40 aatgttattc cttttccgga ttgccccaca gaaccccccc tttccatctc tctccccctg 6840
 cttctatgag ggtgttcccc caccaccca catactcctg cctccctgac ctcacactct 6900
 cctacactga ggcataagagc cttcactgga ccaagggcct cttctcccat tgatgcccga 6960
 45 caaggccatc ctctgctaca tatgtagttg gagccatggg tccctccatg tgtactcctt 7020

50

ggtagtggt ttagaccctg ggagctctgg ttggttcata ctggtgttct tgctatggg 7080
 ttgcaaacc cttcagctct ctcattactt tctctaactc ctccattggg gacttcattga 7140
 tcagttcaat gggtggcttc gagcatctgt atttgtgtat gtcaggctct ggcagagcct 7200
 5 ctcaggaggc agttatgtca ggctcctgtt agctcagttc cttttctcta cttctttaca 7260
 gttcaggaca tcttgccctag ggaatggcac caaccatagt gggctggatt ttcccatatc 7320
 taataactta attaaaatac tctataagac caacttgata tagacaattc tttcttggtt 7380
 10 cctcttctct ggtgactata gattgtgtca atttgacaag gaaagctaac taccataccg 7440
 agtctcagaa tatttcttag agcacatgaa aaatatcaag tgtatacatt tgtgattgct 7500
 tgtaccacat tttcatttga cactagacaa tttctttagt tcagtttttc actctcctat 7560
 cttttgctcc agttttttaa aatactttgg tccccagagg ttaggacagt ttttgaatgt 7620
 15 gtccactct gattttgtgt tttgtttttt cagtgaaaac aagagagtat ataattgtgtt 7680
 caaatttctc cttaattgtga taaaaatcaa gtgtttttta aaattccata actggattaa 7740
 ataggaaaaa atagactttc ccatggtgtg ccaccaagaa aaaaatgcag agttcactgg 7800
 20 agatgcagcg agtttttgtt ttgcttataa cactccattc ctcttgctca ttctctatt 7860
 ctcttccagc atctacctcc aagtcttctc ctagttattt tatgtgtgaa tgagaatcta 7920
 agtcagtctt acctctttta ggctatgccc tctataacta aagttatgga gaattagaga 7980
 aacattcaga taactttgaa tcaataaaaa cacctgttgg gggccttgaa gttacatagc 8040
 25 tgtacaaaac cactaacatt agggaaatat ttcaatgtaa tacacaggaa aagaaatgac 8100
 taaatttgta cacatatccc actttccatg tggcaatatt agacttagga tagttacaat 8160
 taaatacata tatattaatt aaattaattt atagcagtaa ataattggaa ataagctaga 8220
 30 taatgttatg ttaagttgaa agtgacacag agaatcatat tttagataca aagcatcaaa 8280
 atcagaaata cagacctgtc aatcaattta gagctaatta ctgatactga gctgggaaga 8340
 ttatttgaa tcagcaattt gagcccagac agcaatacag caagactccc atatcaaaat 8400
 aaaagaaaag tttgttgagc acacacaatt ctgctagctt atttaggtga tgagaatata 8460
 35 gcaattggaa aaaatggaga atacttatta tcaaagacac cacactcaag tagatgtgag 8520
 aactagaaa aatggccaaa ttaattgata acatacttct tgctaaccac ttacatgaag 8580
 aaaattacag caatgcagag cacggtagtc agaggagaac aatgctgagt gttgattgtc 8640
 40 tatgtaattgt gttattggca aagcaccata gagtaaacag tatttgaata agaaagatat 8700
 ggggacgcct agattataag cggttcttat tctagtcttg tgtgatttgt ctctccattc 8760
 cactcccttc ctcatccta ttacctgaga tgagatacag agttattaag atctgaagcc 8820
 tctcaaaaac agagagatag tttattctct caatagattc gaaatatggt ctgggaaaag 8880
 45 tagtatatat agtccaggta aagaagccac ctgaaggcag taaaacatat agaggatgga 8940

50

	atagtcatgg aaacatgac	tttttcttcc tctttttcaa	tttcttatag aactatcatc	9000
	ctcaaaatgg cacatgacat	ctcccaaacc tcaactgtgtg	aatacgacat ctgatgggaa	9060
	gctgaagata ctgcagagtg	gcacatatat aatctacggc	caagtgattc ctgtggataa	9120
5	gaaatacata aaagacaatg	cccccttcgt agtacagata	tataaaaaga atgatgtcct	9180
	acaaactcta atgaatgatt	ttcaaattctt gcctatagga	gggggtttatg aactgcatgc	9240
	tggagataac atatatctga	agttcaactc taaagaccat	attcagaaaa ctaacacata	9300
10	ctgggggagc atcttaatgc	ctgatctacc attcatctct	tagagattgg gtttgggtctc	9360
	ctcatcttct tctttgtatc	ccgagatgct ggtgggtggg	ttggaggggg atgattgatg	9420
	gcaatgcaca cagtttgtga	gggcttatac attgacacaa	tcagagcctc ttggcatata	9480
	aaattttagc cctcatatct	gtctgaagag gactcagcaa	atggggcaat ccctaattgtt	9540
15	gggtctgcaa atggacttgt	acaatccatg ataaaaagga	gtatgggcca cagaagacag	9600
	aaactcttcc aaagaatgtc	tttctaacct tgatccctgg	gtagaatgag atcctgtttc	9660
	catgggagtc ttacttggct	tgcaaaaaag ggtgtagggc	agtagcttgg ccttttttcc	9720
20	atcataatct ccttgagctg	ttttacctta atccctccaa	actctcacct tctgagagcc	9780
	tcctaataaa acattgttag	actgggtggg tggccaagac	atgccaacaa cacccttctt	9840
	tagagggtgg gtttttagag	gacagagaac attatgaagc	ctagagcagc agagggtcaag	9900
	atgccacgaa atggaattga	tctgggaatt tttttttttt	ttcattctca ggatgcagggt	9960
25	tcattctgaa ctttccccta	ggccttcatt gcttttgtgt	gtatgtgtgc ataaattctg	10020
	caaatagaaa aatgagagtt	tgcaccagta ctactagat	ttaacaccag aaagtgggtac	10080
	ttttctggct gtattatgcc	atgatagcac attttctgtt	gggtgttccct aactgacaag	10140
30	tataacagtt ttctaaacc	acacaacaat gctatgatgt	taatggggta gatatttttg	10200
	gaaaaaaatt gcacagtga	aacatgggta gatgaaccct	aagactctta cctcaattca	10260
	gaactcgcaa ggagttaagt	gagtgggggt		10289
35	<210> 4			
	<211> 22			
	<212> ДНК			
	<213> Искусственная			
	<220>			
	<223> Прямой ПЦР-праймер GITRL Mus musculus			
40	<400> 4			
	atggaggaaa tgcctttgag ag			22
	<210> 5			
45	<211> 25			
	<212> ДНК			
50				

	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Обратный ПЦР-праймер GITRL Mus musculus	
5	<400> 5 gaatggtaga tcaggcatta agatg	25
	<210> 6	
	<211> 39	
	<212> ДНК	
10	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Прямой ПЦР-праймер GITRL Mus musculus, содержащий участок SalI	
	<400> 6 tttaaagtcg acccaccatg gaggaatgc ctttgagag	39
15		
	<210> 7	
	<211> 42	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
20	<220>	
	<223> Обратный ПЦР-праймер GITRL Mus musculus, содержащий EcoRI	
	<400> 7 tttaaagaat tctcattaag agatgaatgg tagatcaggc at	42
25		
	<210> 8	
	<211> 534	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
30	<221> CDS	
	<222> (1)..(534)	
	<400> 8	
	atg tgt ttg agc cac ttg gaa aat atg cct tta agc cat tca aga act	48
	Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro Leu Ser His Ser Arg Thr	
	1 5 10 15	
35		
	caa gga gct cag aga tca tcc tgg aag ctg tgg ctc ttt tgc tca ata	96
	Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ile	
	20 25 30	
40		
	gtt atg ttg cta ttt ctt tgc tcc ttc agt tgg cta atc ttt att ttt	144
	Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser Trp Leu Ile Phe Ile Phe	
	35 40 45	
	ctc caa tta gag act gct aag gag ccc tgt atg gct aag ttt gga cca	192
	Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro	
	50 55 60	
45		
	tta ccc tca aaa tgg caa atg gca tct tct gaa cct cct tgc gtg aat	240
	Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn	
	65 70 75 80	
50		

aag gtg tct gac tgg aag ctg gag ata ctt cag aat ggc tta tat tta 288
 Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu
 85 90 95
 att tat ggc caa gtg gct ccc aat gca aac tac aat gat gta gct cct 336
 Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro
 100 105 110
 ttt gag gtg cgg ctg tat aaa aac aaa gac atg ata caa act cta aca 384
 Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr
 115 120 125
 aac aaa tct aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt 432
 Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val
 130 135 140
 ggg gac acc ata gac ttg ata ttc aac tct gag cat cag gtt cta aaa 480
 Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys
 145 150 155 160
 aat aat aca tac tgg ggt atc att tta cta gca aat ccc caa ttc atc 528
 Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile
 165 170 175
 tcc tag 534
 Ser
 <210> 9
 <211> 177
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro Leu Ser His Ser Arg Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ile
 20 25 30
 Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser Trp Leu Ile Phe Ile Phe
 35 40 45
 Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro
 50 55 60
 Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn
 65 70 75 80
 Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu
 85 90 95
 Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro
 100 105 110

Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr
115 120 125

Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val
130 135 140

Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys
145 150 155 160

Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile
165 170 175

Ser

<210> 10
<211> 10331
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 10

attaatctca aactttatctt tttcttataa aaagtgattt tcttatctag aaataatctg 60
gaatactttc ttagatgaga gcacaccact ttattctccc aagcctcctc tacacgtgca 120
ctgtactgcc gtttgattta ggaaagaaat ttttttcccc tctgaacttc ctttgtgctt 180
ttttttttat gttctgagtt tgtgttggtt ttcagccttc cgttcctttt gttgtatttg 240
atctgggtgcc aaatgagagt cagcacttaa gttataagta tcattttcta acacagtgac 300
agaaggaaaa ctccgccttc cacaccact actaattacc atattgctac aaaacatgac 360
attgcatcct tcacccatca cttgtgaatt tttgttttcc acagctctca tttctccaaa 420
aatgtgtrtg agccacttgg aaaatatgcc ttttaagccat tcaagaactc aaggagctca 480
gagatcatcc tggaagctgt ggctcttttg ctcaatagtt atgttgctat ttctttgctc 540
cttcagttgg ctaatcttta tttttctcca attagaggta aggaggcaat tgtacctaag 600
gttactatct gctataatcc tctatttatt tgtttttcta gttgttatca ttgtcactca 660
gtattgttag caatagttgg aaggaagaga tgtgtataca taatgtaa acaattctaa 720
tattgtcatg acatggcgtt tgaagtttat ctaaaggttt tgagataaaa ggtatcagaa 780
aatgctaaat gttagctgca gaactctgtt agatagagag aactgggtta gccaatgac 840
aggggcctgt ggagtatttt tccttccctc tgctatagct cttgggtggaa taaaaaaggt 900
aaaaatatga atgaatatca aggaatggga tgcaagctat agtcttattt atggaaaaga 960
cttaaaaaaa tagtgaaaaga caggattaag taaatgacag gtgggtttgtg tgtctttgag 1020
gaggggaagtg gccctgagct aggtgtaaga agatctggat tctggttctg ggtctcctaa 1080

taaccagctg tataaatttg ataaagacat ttaatctctc tagtttgcag cttctttatc 1140
 taaaaaaaact ggtggtaggg gaatggattt attatgatgt ttcttctagc tataaaatgt 1200
 catgatcaag aattttattta agggtagtat gaagaataaa tgcctaagtc actcaaaagc 1260
 5 aggggaacaat gacttttagat tgagttgatc aggggaagact tcatggagga atgagaaagc 1320
 ccatatctat ttgggaagcc cctgatgctt gtcaggaatt tccattgag atgcaggcca 1380
 agctgtgggc ctagagaatg ggatggtaca ctgggaatgg agattagttt tgttctttac 1440
 10 taaaaaatct ttcttcacag ttaactacgt agcactgatc aaaaagaaaa taagaaatgc 1500
 tttattttatt tcaggattta gcctatttct ggctaaattt gaagactcta agttttgggg 1560
 agaataaagt ggcatatgtc catctgagaa agagttgaaa tgtgactgca gaaacacttt 1620
 tcttaaggga actgaccagc aaagatttca aagatatagt tctaccaett aagataagta 1680
 15 aaagtaattg agaaaagatg caggaggaag cagtccccta ttgatattaa tttagagtag 1740
 gtatagcttt ggccaatttt tccacagtag cccattaatt tgtattccat aactgtatac 1800
 aaggcttatg tgcaacagag gcatttctaa ttacaaccct gctctctcaa gaaatgtatg 1860
 20 aagcagaagt gtgaactttc tgggtcagtg aagttgaaag aaagaattgt cagaaattct 1920
 tagtgtctag atttctgaag aagaggaagg gtgagaatag caataactta aatttggaag 1980
 tgcttctttc ttctaaaaat tataagatta attagccaga taaccctgaa gaacactgaa 2040
 tataagcatc atcagttcct acatatgact caggaatgaa tacacagaag cctttcccaa 2100
 25 aggcacccag cagttcttgc aaagggaaaag agaaaagtcta ataatgccag atcatctggg 2160
 acacctctct tcagaatcaa actggattaa tcccatgtgt ttgagctctg attctggttt 2220
 ctctctccta gatccagttt ctcaatgaaa tgttctacct cttaaagataa cccagagttt 2280
 30 gtttcaaatt tggggaagta taaaatgttt ttagaatatt gttctgacag gacacttgca 2340
 ggatttggtt ctatgggaaa agccagtggc ctggccaacc atacatgata ttagcttctg 2400
 catttcactt tccacttacc tgtacttccc ttccctattt ggccacaaat aaatatctct 2460
 35 ggaaaagaag tctgagaggc tggcagatag tgattcatta tgatgtggcc acttccacat 2520
 tgtcacaata cccatgaacc gtgaagtttt attttggctt cactctagt ttttacatac 2580
 aaagtccac tttccagatt gtctagacac tactttaaaa agtgtacact taaaagaaaag 2640
 tgtaacactt taaaaagtgt tagatgggaa gcttggctcc ttgggtcaat ttttttcttt 2700
 40 ttttctctct tctttgagaa aatatttaac taaaaggata gctgtgagtc caaggagttt 2760
 ggtcaatccc tcagtgaata taatctcaca ggaattatca ctaagaaatc aaatgttcag 2820
 cagagtctga acttcagcaa aatgaaggat actttcagaa ggggaagttg tacttatact 2880
 45 taaaagcaga gcagatttta ttttactga tgatttgatt agggttggtt tggagagaga 2940

50

atgattgttt tggccatttt gagccgaact acgtaaatct agccttaaatt caagaagagg 3000
 ttacaaaagc aactgatcct tctaagcaaa aataacgaac ccatatgtgt ctttaaaagt 3060
 gggatatttac tacttccaaa catcagcaga attataaata gaaacttacc ccacagagtg 3120
 5 gtagagggtga gagtgttgac ccagacaggc tgggtgtaga tctcattctt gccttttatt 3180
 ggctgcatga ccttaggcta gttacttaat ccctctcatc ctcatcttct catctgcaaa 3240
 atgagcaacc taatttttgt agagttgtgc taaggattaa tgagacagta gagtatctga 3300
 10 cataaagtag ctcccagtag aggggagtgat ttaatatgtg ccccatctact attaatgaga 3360
 taataatggg caaaaattta acaagacat ttaacaatat ggatagctct tgcctaccta 3420
 tatcactctc tcaatcaaac actatatctc agagccaaat ttatgatttt gcaattagat 3480
 ggatttttag tgggtggcaat aattagagag tatcacagtg atggctctct tagcgctaaa 3540
 15 tagacataaa gcagcctgca gtatattata cggaatttct gactctggaa attagtttgg 3600
 acttaggttg tctatagctt aggtttctct gagcacatct catacatgct agtagatggt 3660
 gcagatacta tctgtggcac gtattttggc actcattcat atttagattg ttaccaaatt 3720
 20 gctttgggtg tgtaatcatg tctttctaga aagattataa acttcttgag aagcaaggac 3780
 caaaaattac atttgtttct catgcttaca atgctgtaca atgttggaat tatggatgct 3840
 taaattgtag ttcaattctt cattacaatc accatcatca cccaaacagc taatatttat 3900
 tgaacagggtc caggcaggat atctaggcaa agcccttatt aaaaacgacc tcatttaacc 3960
 25 ccaacaactt caacaagcta ggtgctatta tttctcccat tttatagatg aggaaattgg 4020
 ggttaaggga gtctttgtca cgtccctatc atgggttgaa ctaaattgaa tttcaacatc 4080
 tcctccagga aacaccaaaa tgaggatgaa ataattgcaa gaggccaggc acagtggctc 4140
 30 acgcctataa tcccagcact ttgggagggt gaggcgggta gattgcttga ggtcaagagt 4200
 ttgagaccag cctgggcaac atggcaaaac cctgtctcta caaaaaata caaaaaaat 4260
 agctgggctt ggtggcatgc acctgtagtc ccagctactc agggggctga cgtgggagaa 4320
 ttggttgagt ccaggaggat gaggtgtag tgaactgaga taacaccact gcactccagc 4380
 35 ctgggcaacg gaatgagacc ctgtctcaaa aaacaacaac aacaacaaca acaacaaaaa 4440
 aaaacaagt tagggaatca aaaaatttat ttcctagaat agtggctttc agacttttta 4500
 attgcacctc cttttcaata acatattatc agtataattc ccaacatttg tatgctaatt 4560
 40 attatactat atacaagtac taataatatg tactataaag agatacaca aatatatatt 4620
 tataagggtg agccaaataa tatattcaat gtaactctca caatgcaaaa ccattttgct 4680
 ttcacaaaaa tgttatattt tctataatca ttaatatgtc ataaacatta ctaaaataag 4740
 taaaatattt taataacgtg gtgaatgcat ttattttatt ttttaattct agcttaacac 4800
 45 tatgtgatac agcaatttga agtttgatat gttaatttac cttgtttcat gattttgacc 4860

50

atcatgactg aaaaattacc cgacaaacaa atatagatta aaatggaaga acacatcttt 4920
 ggatattctt atcatgtcat accacttaat tttcaatcca tcattcaatg atgga tgcct 4980
 ctctttcctt ccttcacaa ctaaattcca agatctatag ctttaacacc tccctcgcat 5040
 5 aaactcactc acttgcttct ctctatcttc attatactct aatgacaaaa gctcgactat 5100
 ggaaaacctc caatgctgat taaatccaac tgctctgtct ctttactgt tgaat atatc 5160
 tgaagaaaaa cataaaattt ttgaaagggt cttactttaa attcacagcc actgccttca 5220
 10 agtggatttc attgttgctc tggaaacagc ccatgtttcc ccagtccatt cactctcctc 5280
 tactggatga tttcatacct ttagcttctc ttcaaaccatc taataactct tccccattct 5340
 cactctccac tgataacgtt gcctccatat tttaagagaa aatagaagta cggaggaaag 5400
 aagttccaat atcaacaact cattggcatt tgtgtccagg tatactg tta ttctgtcttg 5460
 15 tcactatgga taaattgtcc atgcatctat ccaagccatc tatgaactaa atcttatcct 5520
 ctcttgccca ctgagggaca ttgttgcaac agttctctcc tcgctcttac atattatgcc 5580
 tcatccattt tacagaaaca tttccatcaa atggaaatag aaaaacgtgt tgtcatttct 5640
 20 ctacattaa aacgtaacaa caacaacaac aacaacaaca acaaaaaacc tcttgatct 5700
 ctcatcctca tccaaactcc actcattttt ttctgtctc cctacagcaa aattcctcca 5760
 acttctcttg tcccatttac ccttaaattt attttaacta agcttctgcc ctctcacat 5820
 atcacagaaa ctaattttgt caagaactcc agtgactacc atgttgctca atctatcagt 5880
 25 caattcactg tactcttctt acttgatcta tcaacagcat ttgacaccag ctgatcactc 5940
 gtccttcatg aaatactttc ttttcttggc ttccaaacat cagactctcc tagtttcctt 6000
 tcagactcag cttttccttt ctattgtccc ttgcttggtc tttctcattc tccgacctct 6060
 30 aaacatcaca acgccccagt gttcctctcc atctacacc actaacatga tggcctcata 6120
 caatctcaca gcttaaaaca tcaactatga gcttaagact cttaaagtga tatcacaga 6180
 gtcctttaa tttcagcctg cttgacacac ttacttggat ttataataag catca caaac 6240
 taatatgtcc acaaccaaac tcatcattgt tcccctcccc atttattcct ctacatctt 6300
 35 atccatttta gtgaataaca actttatctt tccaattatg caggcctaaa atactggagt 6360
 catctttgtt tcttctcatt cctacccca tatccatgtc aggaacttct gttggctcta 6420
 ttttccaacc aagtatcacc atctacagag ctagcacctt ggtcagagac accatgctct 6480
 40 cttgcctaga tgaatgactg taatgatctc ttagctagtc tcactacatt tgcccttgcc 6540
 tctgtttaat ttgttcctag catagcagcc agagaaatcc tacaaaagga aagtgtgcaa 6600
 cacgtttaag ttcaaaaagt cttttaagca ctttgccatt aggaaacca taacc tttgg 6660
 45 gtgatacaaa aaatgtttgt gggtatgcct gaatttacta caacgtattt ttgagcattt 6720

50

agcattaact acttgtgttt gtaaaattaa ccacacactg atggcatctt gtagcatgtg 6780
 aactgccgta cattgcagta gtctgaaact tggaaactgtt ttccagggtg tctcagatac 6840
 tgtatatgac atgtagttat ctgaatatta tacatgggtg gtttcatcaa tctgagttgt 6900
 5 aatattttct agggcttaaat ttactgtttt aaataaaata aacataaata gaagcttcac 6960
 tattttcctt tcacatgcca acagatcacc ttgtgcagtc actgggggtg ggaaactgct 7020
 attttgttga aaaactttta gagcccaagg ttgggggggg ggtccgatat caaatagttg 7080
 10 tcctgtaggt atagattagg taatggaatg agatcttgac ctttgtctaa aagacctaaa 7140
 aggggaagcta ggtaataaaa ggtaaaggat ggagccactc aactttaaag ggaggctgag 7200
 agggctgaga catggtgaag ggaaggattt tttttatggt tatagaacac tagtttgctt 7260
 caggaattca aagctctaaa taaatcaatc aaaaaaatta atgacactgt catcatccta 7320
 15 atcaattcat cttttatttc cccaacagac tgctaaggag ccttgatgg ctaagtttg 7380
 tgagtaacct atcttgcag tcttttactt ttcttagttt ttgatgcaag aaggcagggtg 7440
 tcagtgcctt caagaaaacc tgtattttct ttatttcatt tctgagctac tatgtataat 7500
 20 tacttatcat gtactgggca gttgcccaag agctgaggct ttccagggtg aaccaggcaa 7560
 aagaagccca tgccctgata aagcttatgt tgaaggctgc atctctggcc aggaatgagc 7620
 atctctctta ctggcctatg aatctgagat ccgggaatct ctttttaatt ctgtgtttta 7680
 ataaacacaa caagtttcag atttctacaa cctttcctta aagctttct catgtttcac 7740
 25 atattgctaa tgtccaatgg agtatgtgag agagtgccat tgttgtttct aaatgtatag 7800
 aagagcaatg agagtggaa aagtggccac ttcctctact attttctctt ctaagcttag 7860
 ctcttgagtc attttccctt gtggtcacct gatatttgc tagaaaacac accagtttac 7920
 30 agttacactg agccttagat tcttagaata catggaaaat ttccagataaa lacatttttt 7980
 ttaaagttgt ttatagttt caggccaaac atacattttc agttgagaac agaccatttc 8040
 tagagttaac tctgcaacc ctgtgttctt atatagttta aaccagtagg ttcccttggc 8100
 ttgtgggaat tagaaaatgt ctttttgcct gtctcttctt ttgtgttttg tttttgtttt 8160
 35 gcccataagt ggaatggaat gcatggcatg tgtgaaatta tgcttgatg tggtaaaagt 8220
 tgagaaactc aagtgatgct aagggtggtc ttaaattgacc cccttcaca gaattaaatg 8280
 ggagaaccaa tgacacttct tcctgggtgac ctgcctattg cctattacat gtcaaggaag 8340
 40 aagaaattta ctgggtccg agctcattgg cgatactggg tggcttctc ttttgttcta 8400
 gtgatcgtc ttctattctc ctccagaatc taccttcaga gtcttatatt agtcattcat 8460
 atgaatgagc attgaagtaa aaatgttacc tcttcagggt tgttctca tcaagttttc 8520
 tttttaatta tgggacaaag gacaaaaatt atggagaatt gcagaacaga taagcattct 8580
 45 ggggtgtaaa agcacctccc ggggtgtga gatcacactg ctgtgcaaaa ccaagtaatg 8640

50

ttaggcaaac atctaagttt catatgtgct aatgaaaatg aatgattagg tctttacctt 8700
 ttctttacca tttgggacag tattgcacta gggatcctta tatttaaata gtcaagttat 8760
 ttctatttat aaactcataa atttacaatt agctatTTTT gggggattta tttaatgaat 8820
 5 cctaagtagg tcttaaataga tatataccta caaactgagg agaacagcca taatttagac 8880
 acaaagcacc taattcagga acatggaagt atcattcaat caataaatat ttatggaaca 8940
 tctaccaggt accagggact ttttcaggtg ctgaaaatac aagaatgaac aaaatagaga 9000
 10 tatatttgtc ctaaaaaatt ttacattcaa agtgatacaa gatggacaat aaacaaatga 9060
 acaatttagt ttataacatc ctagacactg acacacttta tgaagaaaac tcaagcaagg 9120
 taaaatgagg gaatgatagg agaacacttt ttaatatagc ataattaagg aaagccacac 9180
 tgataaagtg ataaacagcc agtggtatTT acaccgaaaa tgcctggaaa ggcattggact 9240
 15 gccaaccttg gttttcaaaa ttttggcttg tgatttcttt ctccattagt cttttcttct 9300
 cttttctttt tcccacaaat attaatcaac aagagatgCG aagtcactta agtcattttt 9360
 ctattccaaa ttcttttctt tagaattctt gctccaagca agaaatactc tttggatttg 9420
 20 caatttctct aaaacaagga gtagataggt acttaaaata gaaaaattct gcttgaagag 9480
 aactagtgtg gatcaggtaa agaaacaaca tgtatgtggt aaataattaa ctacaatctg 9540
 gaaaaggatg aaataatgaa ataactatgc tttcatcttt tttatccttg tatatttctt 9600
 ataggaccat taccctcaaa atggcaaatg gcatcttctg aacctccttg cgtgaataag 9660
 25 gtgtctgact ggaagctgga gatacttcag aatggcttat atttaattta tggccaagtg 9720
 gctcccaatg caaactacaa tgatgtagct ctttttgagg tgcggctgta taaaaacaaa 9780
 gacatgatac aaactctaac aaacaaatct aaaatccaaa atgtaggagg gacttatgaa 9840
 30 ttgcatgttg gggacaccat agacttgata ttcaactctg agcatcaggt tctaaaaaat 9900
 aatacatact ggggtatcat ttactagca aatccccaat tcatctccta gagacttgat 9960
 ttgatctcct cattcccttc agcacatgta gaggtgccag tgggtggatt ggagggagaa 10020
 gatattcaat ttctagagtt *gtctgtcta caaaaatcaa cacaaacaga actcctctgc 10080
 35 acgtgaattt tcatctatca tgcctatctg aaagagactc aggggaagag ccaaagactt 10140
 ttggttgat ctgcagagat acttcattaa tccatgataa aacaaatatg gatgacagag 10200
 gacatgtgct tttcaaagaa tctttatcta attcttgaat tcatgagtgg aaaaatggag 10260
 40 ttctattccc atggaagatt tacctggtat gcaaaaagga tctggggcag tagcctggct 10320
 ttgttctcat a 10331

45 <210> 11
 <211> 21
 <212> Белок

50

<213> Apis mellifera

<400> 11

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

<210> 12

<211> 13

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический PLP-пептид

<400> 12

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

Формула изобретения

1. Способ лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или отторжения трансплантата, включающий введение субъекту антагониста GITR, в котором антагонист GITR предотвращает связывание GITRL с GITR на эффекторных Т-клетках.

2. Способ по п.1, в котором антагонист GITR выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, и низкомолекулярного антагониста.

3. Способ лечения субъекта при риске или поставленном диагнозе аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или отторжения трансплантата, включающий введение субъекту антагониста GITR, в котором антагонист GITR выбран из группы, состоящей из антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siRNA против GITRL.

4. Способ по п.1 или 3, в котором аутоиммунное нарушение или воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, энцефаломиелита, остеоартрита, рассеянного склероза, аутоиммунного гастрита, системной красной волчанки, псориаза и других воспалительных дерматозов, диабета I типа, астмы, аллергии, отторжения органного трансплантата, болезни трансплантат против хозяина и воспалительных заболеваний толстого кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит.

5. Способ по п.4, в котором аутоиммунное нарушение представляет собой рассеянный склероз.

6. Способ ингибирования пролиферации популяции клеток, содержащей эффекторные Т-клетки, включающий введение в клеточную популяцию антагониста GITR, в котором антагонист GITR предотвращает связывание GITRL с GITR на эффекторных Т-клетках.

7. Способ по п.6, в котором антагонист GITR выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, и низкомолекулярного антагониста.

8. Способ ингибирования пролиферации популяции клеток, содержащей эффекторные Т-клетки, включающий введение в клеточную популяцию антагониста GITR, в котором антагонист GITR выбран из группы, состоящей из антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siPHK против GITRL.

9. Способ по п.6 или 8, в котором эффекторные Т-клетки представляют собой CD4⁺Т-клетки или CD8⁺Т-клетки.

10. Способ супрессии клеточной популяции, содержащей эффекторные Т-клетки, в присутствии CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток, включающий введение в клеточную популяцию антагониста GITR, в котором антагонист GITR предотвращает связывание GITRL с GITR на эффекторных Т-клетках.

11. Способ по п.10, в котором антагонист GITR выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, и низкомолекулярного антагониста.

12. Способ супрессии клеточной популяции, содержащей эффекторные Т-клетки, в присутствии CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток, включающий введение в клеточную популяцию антагониста GITR, в котором антагонист GITR выбран из группы, состоящей из антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siPHK против GITRL.

13. Способ по п.10 или 12, в котором эффекторные Т-клетки представляют собой CD4⁺Т-клетки или CD8⁺Т-клетки.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая антагонист GITR и фармацевтически приемлемый носитель для лечения аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, в которой антагонист GITR предотвращает связывание GITRL с GITR на эффекторных Т-клетках.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, в которой антагонист GITR выбран из группы, состоящей из нейтрализующего антитела против GITRL, нейтрализующего антитела против GITR, слитого белка, содержащего GITR, слитого белка, содержащего активный фрагмент GITR, и низкомолекулярного антагониста.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая антагонист GITR и фармацевтически приемлемый носитель для лечения аутоиммунных нарушений, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата, в которой антагонист GITR выбран из группы, состоящей из антисмысловой в отношении GITRL молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы нуклеиновой кислоты siPHK против GITRL.

m 1MEEMPLRESSPQRAERCK.KSWLLCIVALLMLLCSLGTLIYTSL 44
: | | | | | : | | | : : | | | | | : |

h 1 MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIVMLL.FLCSFSWLIFIFL 49

m 45 K.PTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDGKLKILQSGTYLIYG 93
. | | | | | | | | | | . | | | | | | | | | |

h 50 QLETAKFPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYG 99

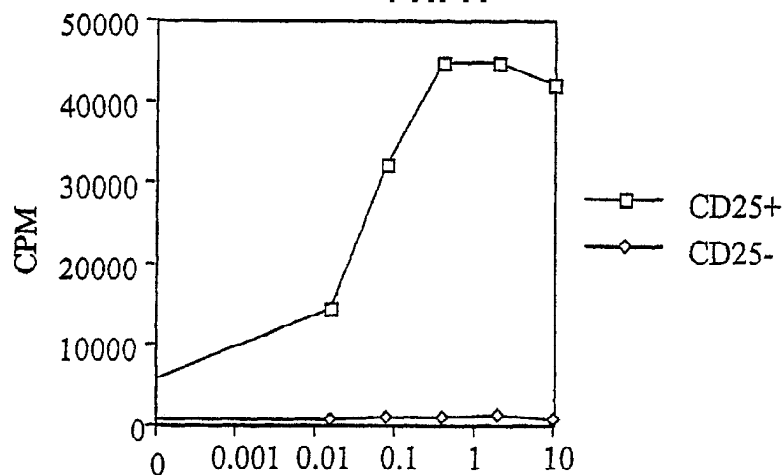
m 94 QVIPVDKKYIKDNAPFVVQIYKKNVDVLQTLMNDFQILPIGGVYELHAGDN 143
| | | . | | | | | : | | | | | . | : | | | | |

h 100 QVAP.NANY.NDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGVTYELHVGDT 147

m 144 IYLKFNSKDHIQKNNTYWGIIILMPDLPFIS 173
| | | | . : | | | | | | | : . | | |

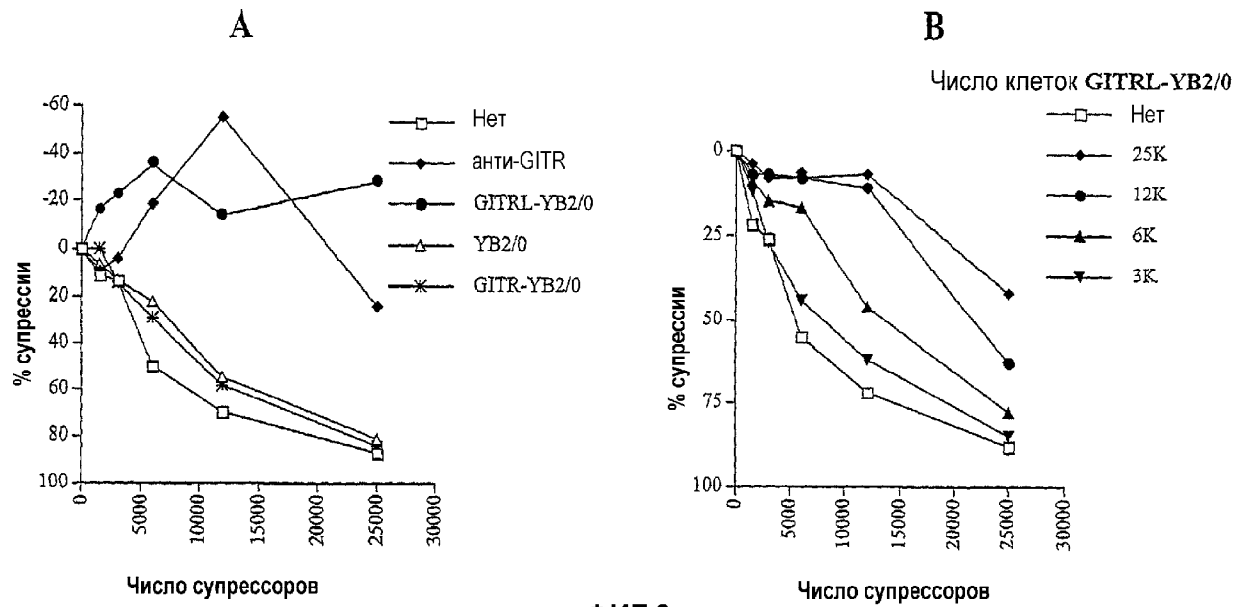
h 148 IDLIENSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS 177

ФИГ.1

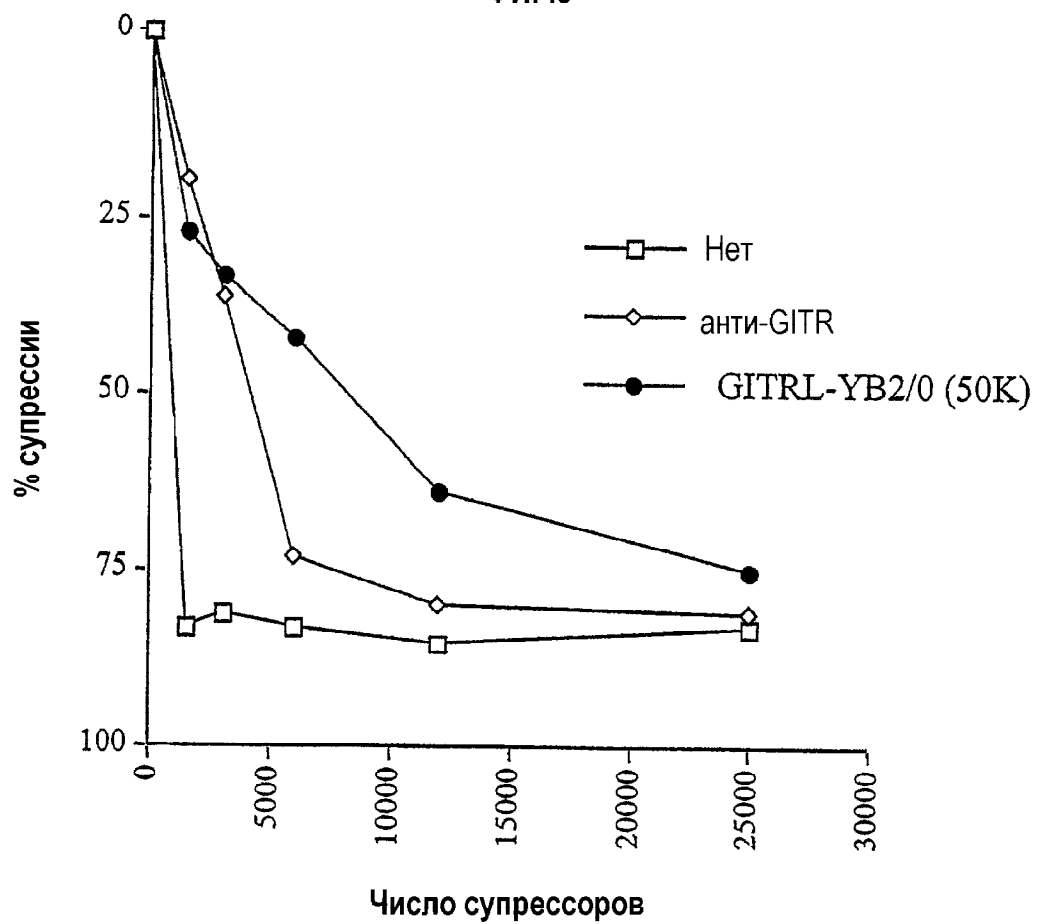


Агонистическое антитело
против G1TR (мкг/мл)

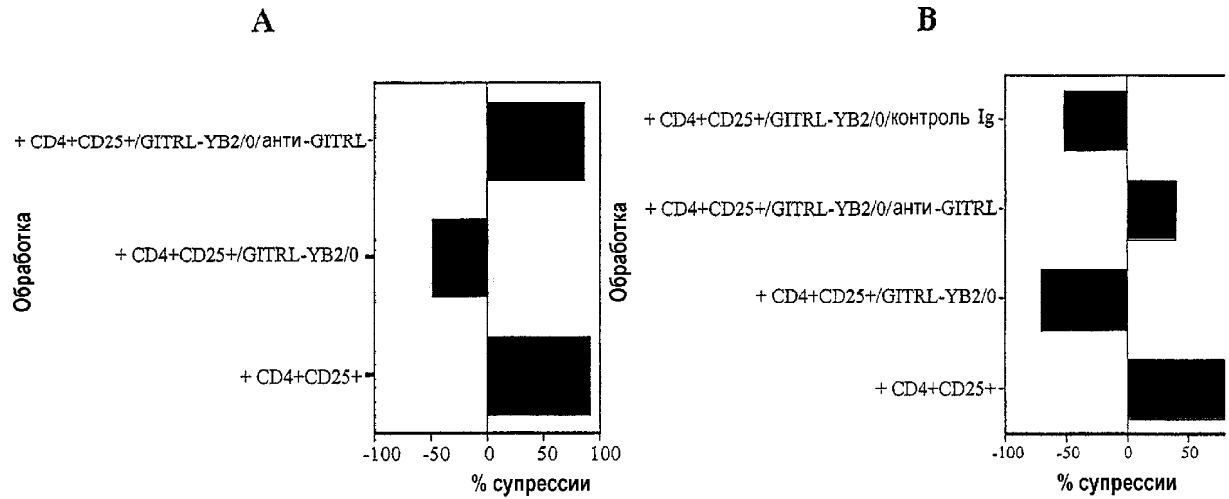
ФИГ.2А



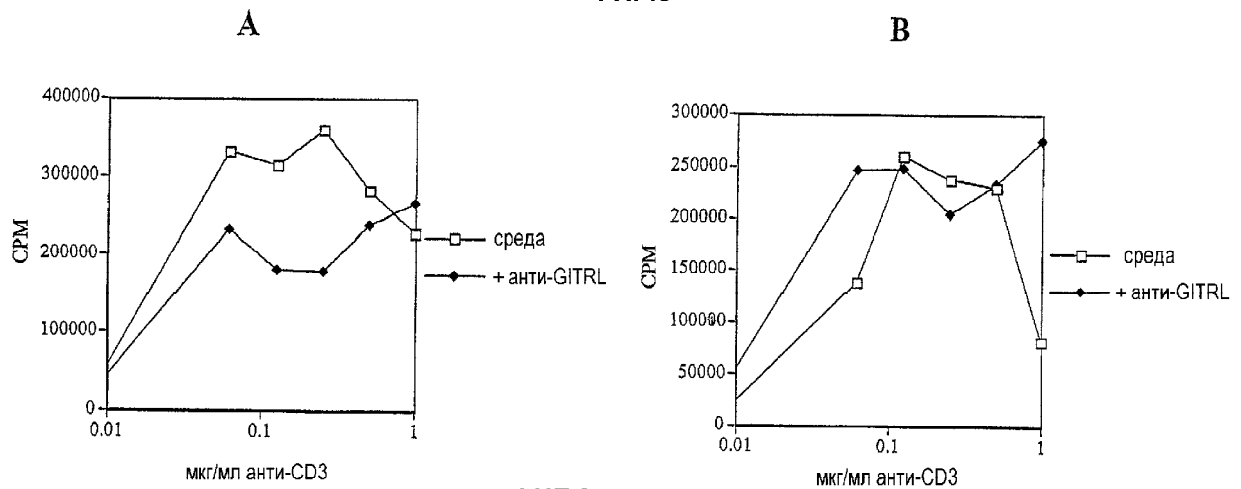
ФИГ.3



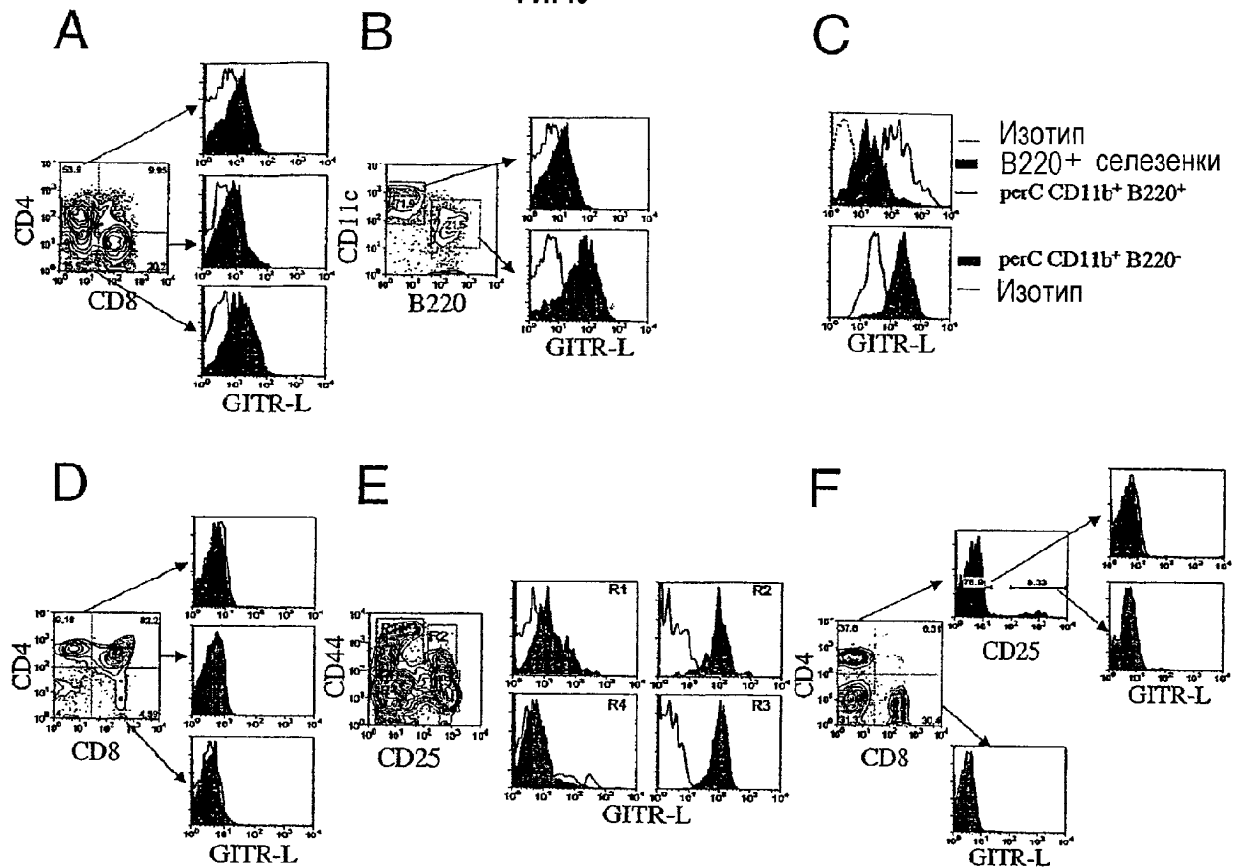
ФИГ.4



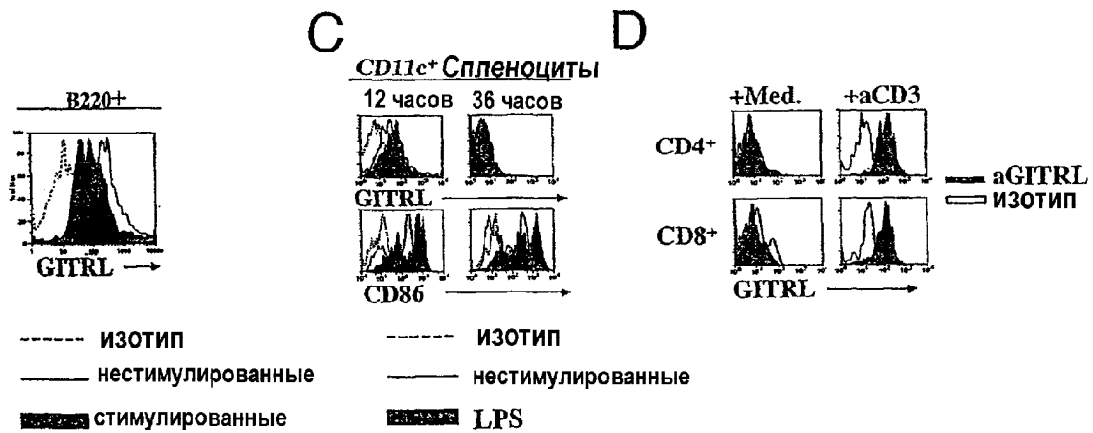
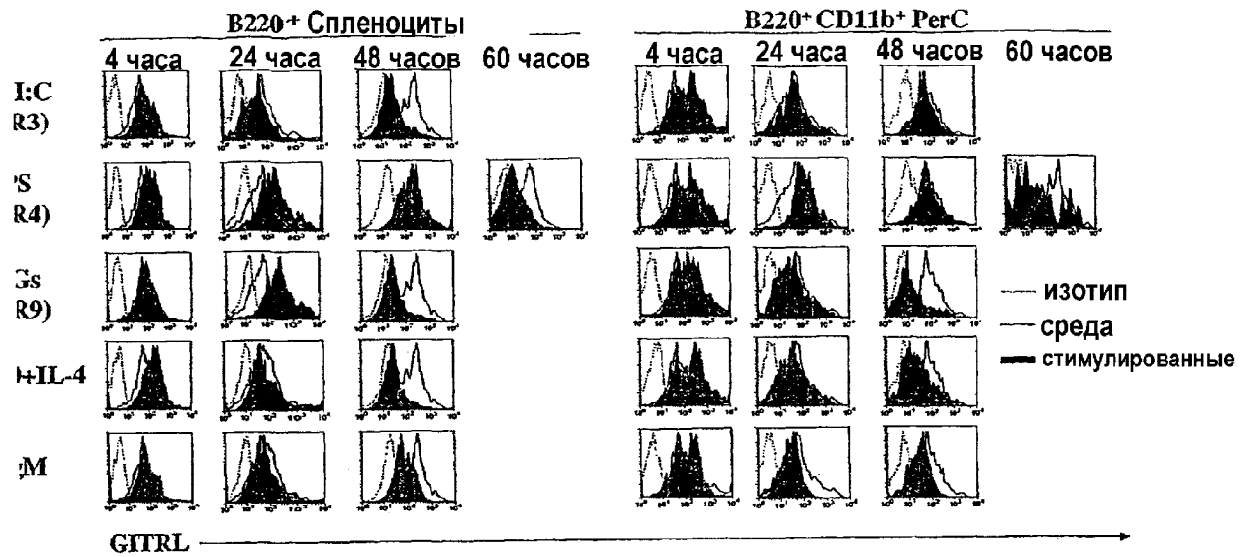
ФИГ.5



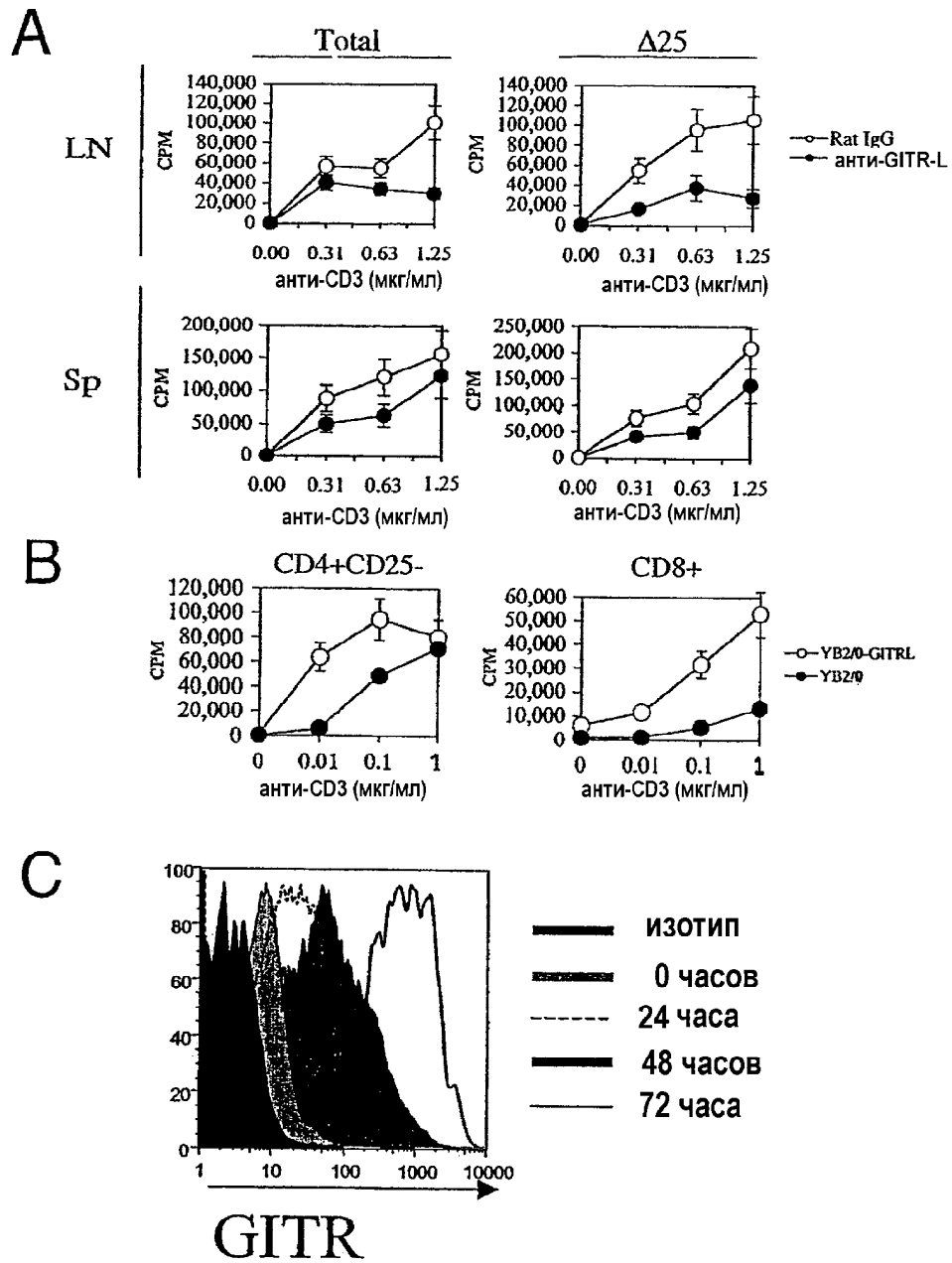
ФИГ.6



ФИГ.7

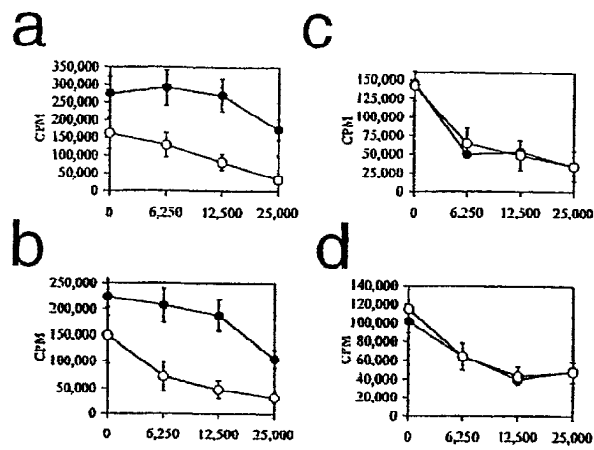


ФИГ.8

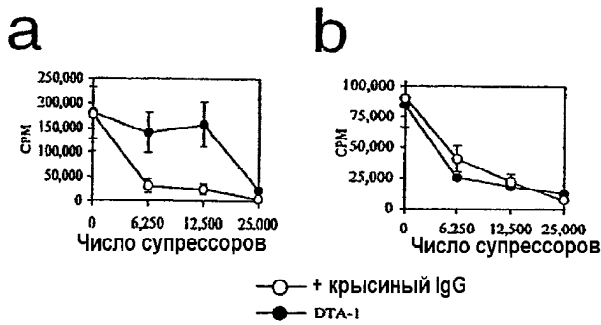


ФИГ.9

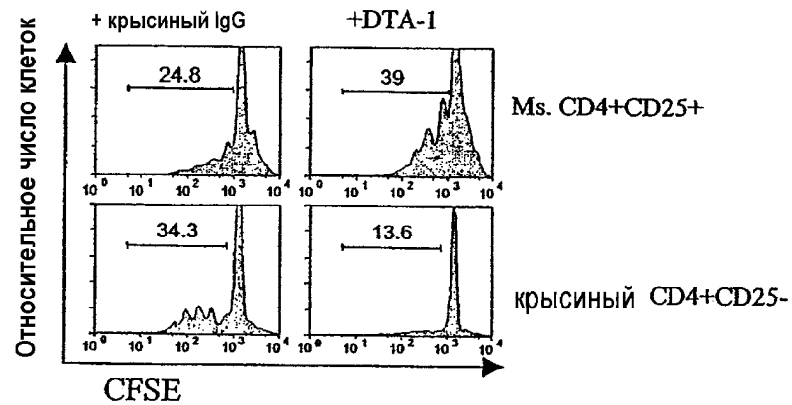
A



B

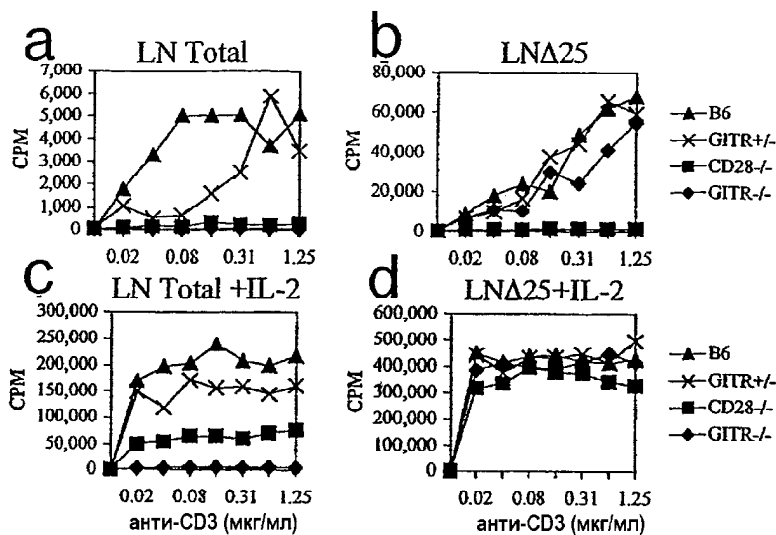


C

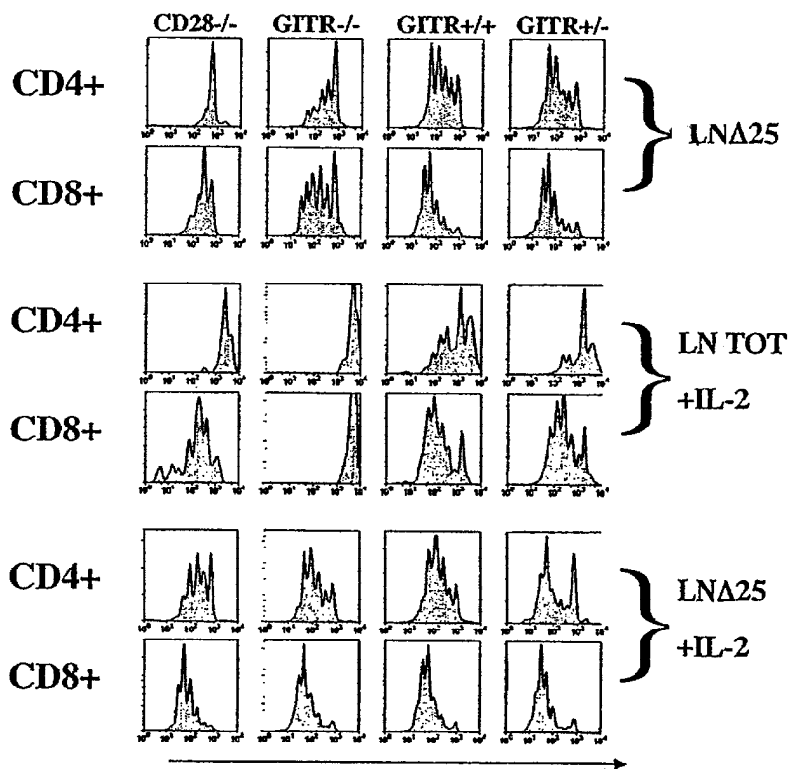


ФИГ.10

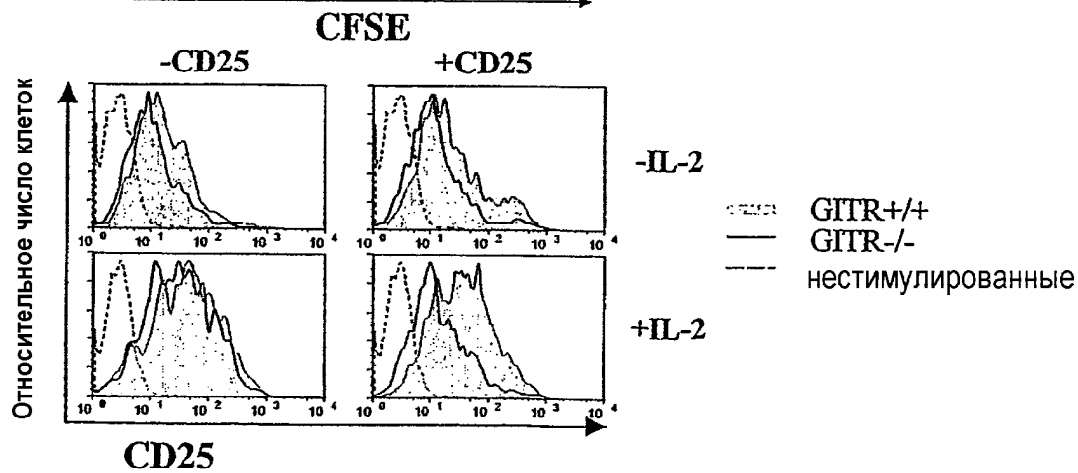
A



B

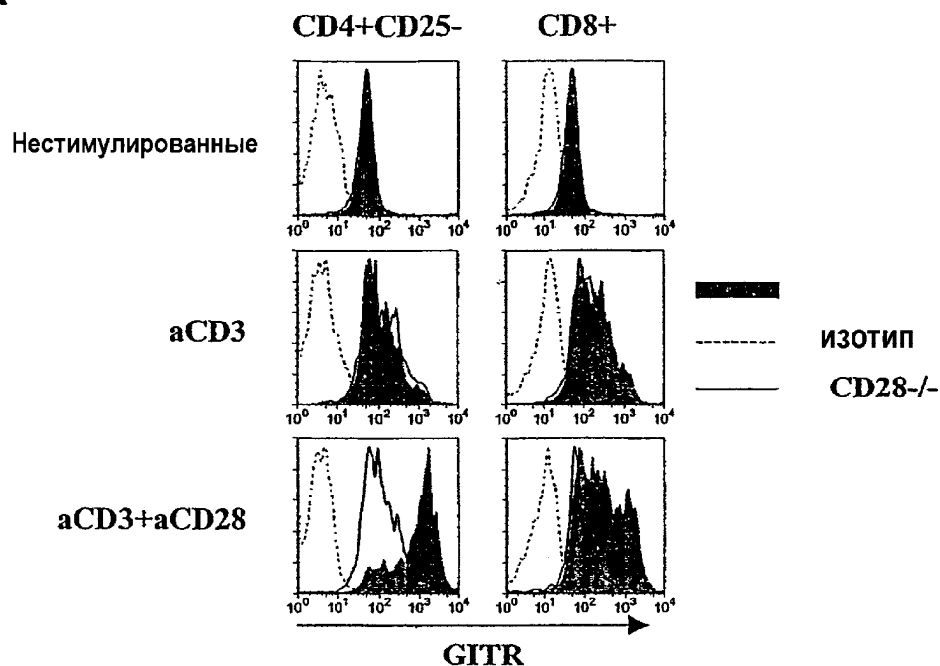


C

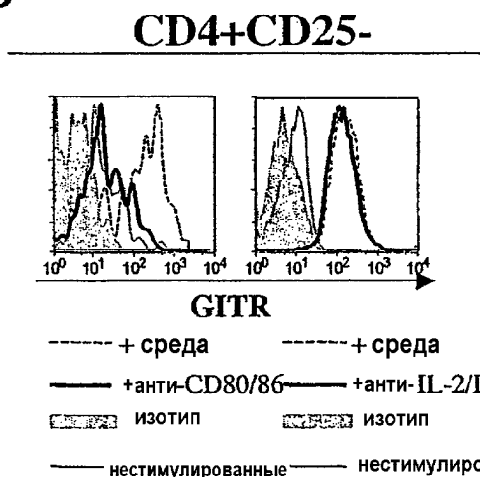


ФИГ.11

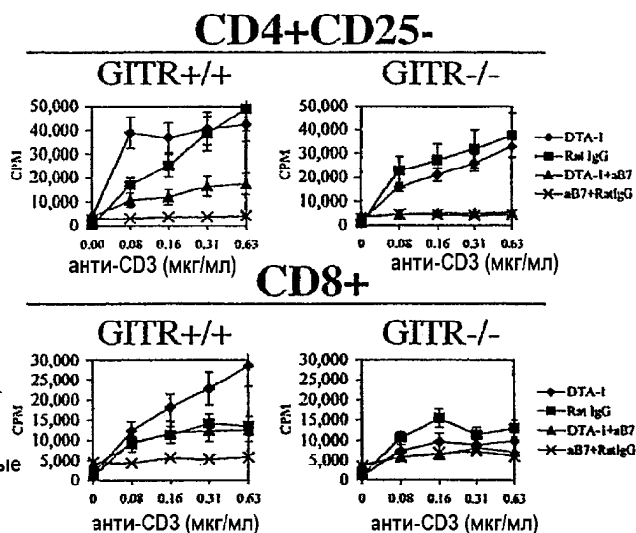
A



B

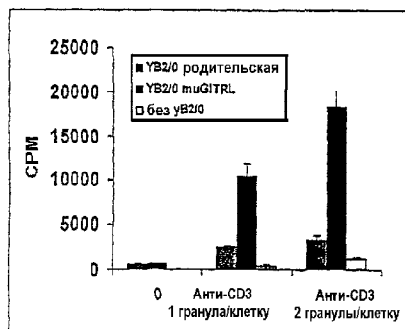


C

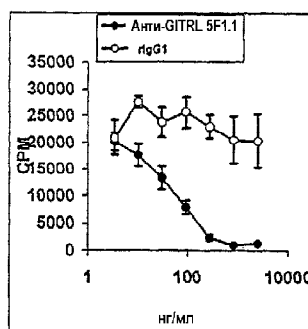


ФИГ.12

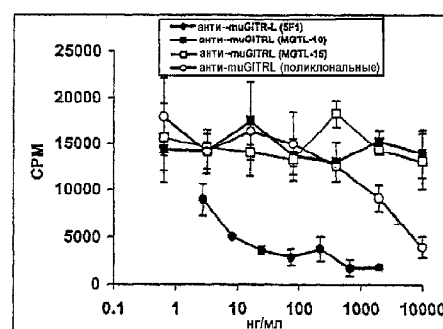
A



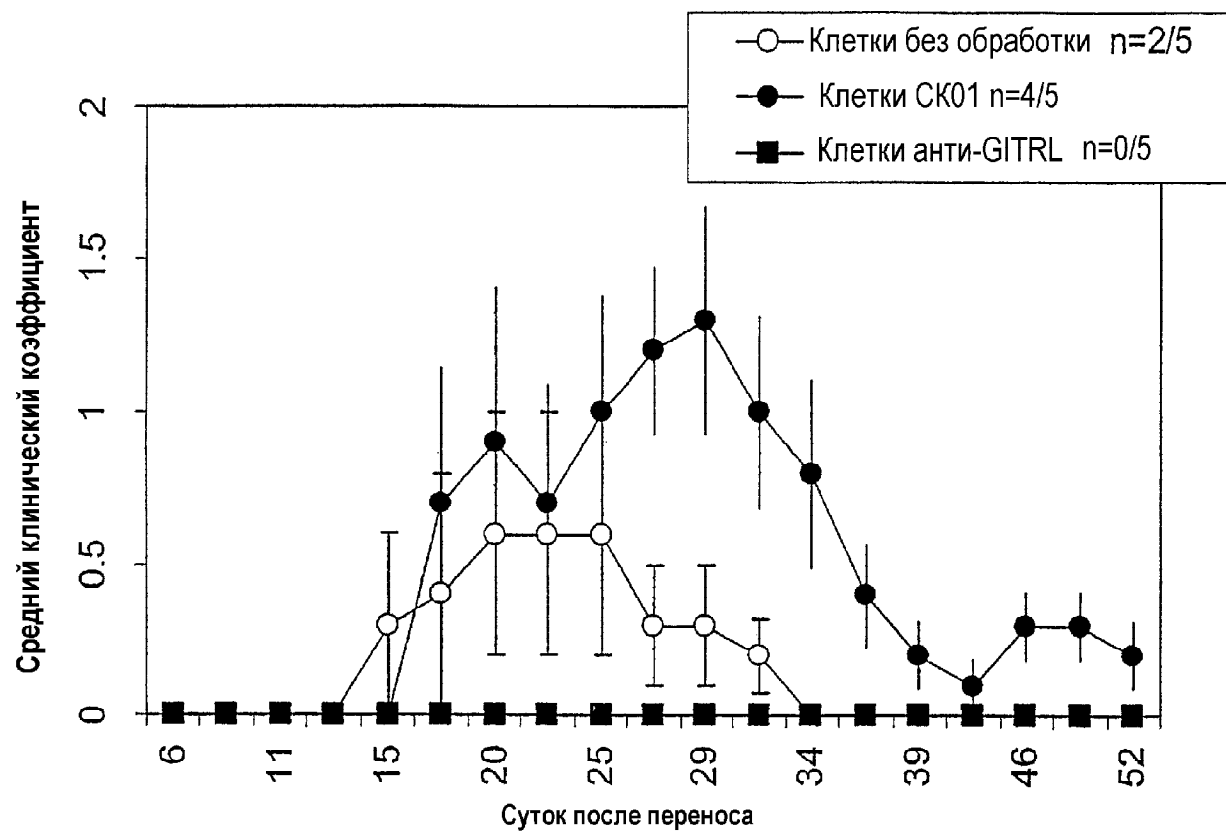
B



C



ФИГ.13



ФИГ.14