



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.26

(21) Номер заявки
201790413

(22) Дата подачи заявки
2015.08.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ TIGIT

(31) **62/038,912; 62/126,733**

(32) **2014.08.19; 2015.03.02**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/045447**

(87) **WO 2016/028656 2016.02.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
**Уилльямс Сибил М. Г., Лафейс
Дрейк, Фаядат-Дилман Лоренс,
Рагхунатхан Гопалан, Лян Линда,
Сегеци Вольфганг (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) JOHNSTON ROBERT J. ET AL.: "The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+T Cell Effector Function", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 26, no. 6, 26 November 2014 (2014-11-26), pages 923-937, XP029111576, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2014.10.018, abstract, p. 923 paragraph entitled "significance", p. 924 right-hand column, first full paragraph - p.933 left-and column 1st full paragraph, p. 933 left-hand column last full paragraph - p. 934 right-hand column line 2, p. 935 left-hand column last paragraph, Fig. 1-6

E. LOZANO ET AL.: "The TIGIT/CD226 Axis Regulates Human T Cell Function", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 188, no. 8, 16 March 2012 (2012-03-16), pages 3869-3875, XP055147473, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1103627, abstract, p. 3870 left-hand column 4th full paragraph, p. 3871 paragraph bridging the left - to the right-hand column - p. 3872 left-hand column 1st full paragraph, p. 3874 paragraph bridging the left - to the right-hand column, Fig. 2 and 3

N. STANIETSKY ET AL.: "The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 42, 20 October 2009 (2009-10-20), pages 17858-17863, XP055215810, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0903474106, abstract, p. 17858 right-hand column 1st and 2nd full paragraphs, the paragraph bridging

p. 17860 to p. 17861, p. 17862 the paragraph bridging the left - to the right-hand column, Fig.1-6

STEVEN D. LEVIN ET AL.: "Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 41, no. 4, 18 April 2011 (2011-04-18), pages 902-915, XP055215809, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.201041136, abstract, p. 904 right-hand column first full paragraph - p. 906 left-hand column last line, p. 911 right-hand column last two paragraphs, p. 912 left-hand column 2nd and 3rd full paragraphs, Fig. 1-8

WO-A2-2009126688
WO-A2-2014089169

B. ALLARD ET AL.: "Targeting CD73 Enhances the Antitumor Activity of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 mAbs", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 20, 15 October 2013 (2013-10-15), pages 5626-5635, XP055216360, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0545, the whole document

TAO ZHANG ET AL.: "Increased expression of TIGIT on CD4 + T cells ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, 1 June 2014 (2014-06-01), pages n/a-n/a, XP055215805, ISSN: 0730-2312, DOI: 10.1002/jcb.24862, the whole document

AMANDA C. FOKS ET AL.: "Agonistic Anti-TIGIT Treatment Inhibits T Cell Responses in LDLr Deficient Mice without Affecting Atherosclerotic Lesion Development", PLOS ONE, vol. 8, no. 12, 20 December 2013 (2013-12-20), page e83134, XP055215806, DOI: 10.1371/journal.pone.0083134, the whole document

S.R. GODING ET AL.: "Restoring Immune Function of Tumor-Specific CD4+ T Cells during Recurrence of Melanoma", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 190, no. 9, 27 March 2013 (2013-03-27), pages 4899-4909, XP055145038, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1300271, the whole document

DEREK A. WAINWRIGHT ET AL.: "Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 4, 1 January 2013 (2013-01-01), XP055211742, ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2013.00116, the whole document

CRISTINA BOTTINO ET AL.: "Natural Killer Cells and Neuroblastoma: Tumor Recognition, Escape Mechanisms, and Possible Novel Immunotherapeutic Approaches", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 5, 1 January 2014 (2014-01-01), XP055216363, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00056, the whole document

(57) Изобретение относится к антителам против TIGIT, а также к применению этих антител в лечении заболеваний, таких как злокачественная опухоль и инфекционное заболевание.

036311 B1

036311 B1

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, принятый в электронной форме в формате ASCII, и его полное содержание, таким образом, приведено в качестве ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 27 июля 2015 г., названа 23808-US-PCT_SL.txt и ее размер составляет 136039 байтов.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам против TIGIT, а также к применению этих антител в лечении заболеваний, таких как злокачественная опухоль и инфекционное заболевание.

Уровень техники для изобретения

Ключевой фактор для обеспечения иммунотерапии опухолей возник в результате открытий, что ингибирующие иммуномодулирующие рецепторы (IMR), которые обычно функционируют как иммунные контрольные точки для поддержания аутоотолерантности, являются центральными для способности микроокружения опухолей уклоняться от иммунитета. Блокирование ингибирующих IMR, по-видимому, вызывает сильные опухолеспецифические иммунные ответы более эффективно, чем прямая стимуляция противоопухолевого иммунитета с помощью активирующих цитокинов или противоопухолевых вакцин, и этот способ обладает потенциалом для трансформации терапии злокачественных опухолей человека. Важное значение и возможность в настоящее время возникает для потенциала разработки новых антител-антагонистов для других IMR и для комбинации антител-антагонистов против более чем одного IMR для увеличения доли отвечающих в онкологических клинических исследованиях, а также для расширения онкологических показаний, при которых иммунотерапия опухолей является эффективной.

Важно, что ингибирующие IMR и лиганды, регулирующие клеточный иммунитет, обычно сверхэкспрессированы на клетках опухолей и опухолеассоциированных макрофагах (TAM).

Примечательно, что сверхэкспрессия PD-L1 в опухолях ассоциирована с истощением опухолеспецифических Т-клеток и неблагоприятным прогнозом. Блокирование лигирования PD-1/PD-L1 в клинических исследованиях приводило к ответам продолжительной регрессии опухолей у значительной доли пациентов. В недавнем сообщении показано, что совместная экспрессия PD-1 и другого ингибирующего IMR (TIM-3) в опухолеспецифических CD8+ Т-клетках, полученных от пациентов с меланомой, являлось ассоциированным с фенотипами более дисфункционального истощения Т-клеток по сравнению с клетками, экспрессирующими любой из IMR отдельно. Более того, в нескольких сообщениях с использованием доклинических моделей опухолей показано, что блокирование множества IMR, включая PD-1, TIM-3, LAG-3 и CTLA-4, более эффективно индуцировало противоопухолевые ответы, чем антагонизм одного PD-1. Эти результаты подчеркивают важность дальнейшего исследования путей IMR.

TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM) представляет собой иммуномодулирующий рецептор, экспрессируемый преимущественно на активированных Т-клетках и клетках NK. TIGIT известен также как VSIG9; VSTM3; и WUCAM. В его структуре показан один внеклеточный иммуноглобулиновый домен, трансмембранная область типа I и два мотива ITIM. TIGIT формирует часть ко-стимулирующей сети, которая состоит из положительных (CD226) и отрицательных (TIGIT) иммуномодулирующих рецепторов на Т-клетках, и лигандов, экспрессируемых на APC (CD155 и CD112).

Важным признаком структуры TIGIT является присутствие иммунорецепторного связывающего тирозин ингибирующего мотива (ITIM) в его цитоплазматическом хвостовом домене. Как и для PD-1 и CTLA-4, предсказано, что домен ITIM в цитоплазматической области TIGIT предназначен для привлечения тирозинфосфатаз, таких как SHP-1 и SHP-2, и последующего дефосфорилирования остатков тирозина с помощью основанных на тирозине мотивов активации иммунорецептора (ITAM) на субъединицах Т-клеточного рецептора (TCR). Таким образом, лигирование TIGIT посредством рецептора-лигандов CD155 и CD112, экспрессируемых клетками опухолей, или TAMs, может вносить вклад в супрессию передачи сигналов TCR и активации Т-клеток, что является необходимым для развития эффективного противоопухолевого иммунитета. Таким образом, антитело-антагонист, специфическое для TIGIT, может ингибировать индуцированную CD155 и CD112 супрессию ответов Т-клеток и усиливать противоопухолевый иммунитет. Целью настоящего изобретения является получение антитела против TIGIT, которое можно использовать для лечения злокачественных опухолей, либо отдельно, либо в комбинации с другими реагентами.

Сущность изобретения

Изобретение относится к антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим структурные и функциональные признаки, указанные ниже.

В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, 79, 80, 81, 82, 83, 59, 90, 140, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166 или 167. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (на-

пример, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 62, 74, 75, 76, 77, 78 или 93. В одном варианте осуществления антитело, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; и (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 140. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; и (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, 79, 80, 81, 82 или 83. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; и (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 58; и (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 59. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 147; и (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 153. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111,

лотную последовательность из SEQ ID NO: 134; и (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 165. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; и (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 166. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; и (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 167. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим: (i) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (ii) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 141; и (iii) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 142. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (ii) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или; и (iii) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 74, 75, 76, 77 или 78. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (ii) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5; и (iii) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему: (i) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 60; (ii) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 61; и (iii) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 62. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему: (i) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (ii) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 148; и (iii) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:

93. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (ii) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121 или 122; и (iii) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (ii) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (iii) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 140; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 141; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 142.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, 79, 80, 81, 82 или 83; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 74, 75, 76, 77 или 78. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-24, 37-47, 143 и 144; и варибельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-30, 48-52, 146 и 147. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3,

79, 80, 81, 82 или 83; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 74, 75, 76, 77 или 78; где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с варибельной областью тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-24 или 37-47, и варибельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с варибельной областью тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-30 или 48-52. В этом указанном выше варианте осуществления, варианты последовательности встречаются в каркасных областях. В одном варианте осуществления антитело связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET).

В другом варианте осуществления изобретение относится также к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены в CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1-3) или в CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 3-6). В одном варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR тяжелой цепи из SEQ ID NO: 3, где замена выполнена в положении 13W и где остаток 13W заменен на: F, Y, I, V или L. В одном варианте осуществления антитело содержит две аминокислотные замены в CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 5, где замены выполнены в положении 3-4 и где остатки 3N и 4S заменены на: SN, SS, ST, TT, SY, NQ, GS, SQ и DS. В одном варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 6, где замена выполнена в положении 7 и где остаток 7W заменен на: F, Y, I, V или L. Последовательности VH из SEQ ID NO: 9-24 и 37-47 обладают CDR из SEQ ID NO: 1-3; и последовательности VL из SEQ ID NO: 25-30 и 48-52 обладают CDR из SEQ ID NO: 4-6. В некоторых вариантах осуществления замены в CDR, описанные выше, можно выполнять в соответствующих CDR из последовательностей VH из SEQ ID NO: 9-24 и 37-37, и в CDR из последовательностей VL из SEQ ID NO: 25-30 и 48-52. В одном варианте осуществления антитело связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающимся с TIGIT человека, содержащим: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 58; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 59; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 60; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 61; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 62. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены в CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 57-59) или в CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 60-62), и сохраняет одну или несколько из его функциональных характеристик. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент необязательно обладает по меньшей мере одной из следующих функциональных характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^9 М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET), (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится также к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вари-

бельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 164; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 165; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 166; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 167; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET), (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TIGIT человека и содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR2 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 89, где замена выполнена в положении 7 и где остаток D заменен на: R, L, K, F, S, Y или V. В другом варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR2 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 89, где замена выполнена в положении 8 и где остаток G заменен на R, N, Q, E, L, K, S, Y или V. В другом варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR2 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 89, где замена выполнена в положении 12, где N заменен на A или S. В другом варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR2 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 89, где замена выполнена в положении 13, где E заменен на Q. В другом варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR2 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 89, где замена выполнена в положении 16, где K заменен на Q. В другом варианте осуществления антитело содержит три аминокислотных замены в CDR2 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 89, где аминокислотный остаток 12 заменен на A или S, аминокислотный остаток 13 заменен на Q, и аминокислотный

остаток 16 заменен на Q. В одном варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR3 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 90, где аминокислотный остаток 6 заменен на A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V или Y. В другом варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 92, где замена выполнена в положении 1 и где остаток N заменен на A, Y, W, S, T, R, H, G, I или V. В другом варианте осуществления антитело содержит одну аминокислотную замену в CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 92, где замена выполнена в положении 2 и где остаток A заменен на N, I, L, T, V. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET), (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В другом варианте осуществления изобретение относится также к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 из любой из SEQ ID NO: 124-129 и/или вариательную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 из любой из SEQ ID NO: 130-133. В одном варианте осуществления изобретение относится также к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 124-129 и/или вариательную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130-133. В одном варианте осуществления остаток D в положении 56 из любой из SEQ ID NO: 124-129 может быть заменен на R, L, K, F, S, Y или V. В другом варианте осуществления остаток G в положении 57 из любой из SEQ ID NO: 124-129 может быть заменен на R, N, Q, E, L, K, S, Y или V. В одном варианте осуществления остаток W в положении 104 из любой из SEQ ID NO: 124-129 может быть заменен на A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V или Y. В другом варианте осуществления остаток N в положении 50 из любой из SEQ ID NO: 130-133 может быть заменен на A, Y, W, S, T, I или V. В другом варианте осуществления остаток A в положении 51 из любой из SEQ ID NO: 130-133 заменен на N, I, L, T или V. В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128, или вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 132. В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128 или вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 133. В другом варианте осуществления изобретение относится также к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 127, или вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 130. В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128 и вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 132. В другом варианте осуществления изобретение относится также к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128 и вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 133. В другом варианте осуществления изобретение относится также к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 127, и вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET).

В другом варианте осуществления изобретение относится также к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему: (i) вариательную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 из любой из SEQ ID NO: 124-129, где вариательная область тяжелой цепи обладает по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 124-129 и/или (ii) вариательную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 из любой из SEQ ID NO: 130-133, где вариательная область легкой цепи обладает по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 130-133. В другом варианте осуществления изобретение относится также к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT

мер, KinExa или OCTET).

В одном варианте осуществления изобретение относится также к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:149 и/или вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:151. В одном варианте осуществления антитело связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET).

В одном варианте осуществления изобретение относится также к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 150 и/или вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 152. В одном варианте осуществления антитело связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с тем же эпитопом TIGIT человека, что и антитело, содержащее вариательную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 7 и вариательную область легкой цепи из SEQ ID NO: 8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М, до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET), (ii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iii) увеличивает активацию Т-клеток; (iv) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (v) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112. В одном варианте осуществления антитело обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с вариательной областью тяжелой цепи и/или вариательной областью легкой цепи из любой из SEQ ID NO: 7-30 или 37-52. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в вариательной области тяжелой цепи из любой из SEQ ID NO: 7, 9-24 и 37-47 и/или в вариательной области легкой цепи из любой из SEQ ID NO: 8, 25-30 и 48-52.

В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с эпитопом TIGIT человека, который содержит по меньшей мере одну из следующих областей: остатки 54-57 из SEQ ID NO: 31, остатки 68-70 из SEQ ID NO: 31 и остатки 76-81 из SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с эпитопом TIGIT человека, содержащим остатки: 54-57, 68-70 и 76-81 из SEQ ID NO: 31.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с тем же эпитопом TIGIT человека, что и антитело, содержащее вариательную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 и вариательную область легкой цепи из SEQ ID NO: 64, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с вариательной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 и/или вариательной областью легкой цепи из SEQ ID NO: 64. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в вариательной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 и/или в вариательной области легкой цепи из SEQ ID NO: 64. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены в CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 57-59) или в CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 60-62).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с тем же эпитопом TIGIT человека, что и антитело, содержащее вариательную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 94 и вариательную область легкой цепи из SEQ ID NO: 95, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной из следующих

характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с вариательной областью тяжелой цепи из любой из SEQ ID NO: 94 или 124-129, и/или с вариательной областью легкой цепи из любой из SEQ ID NO: 95 или 130-133. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в вариательной области тяжелой цепи из любой из SEQ ID NO: 94 или 124-129, и/или в вариательной области легкой цепи из любой из SEQ ID NO: 95 или 130-133. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены в CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 88-90) и/или в CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 91-93). В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой цепи из SEQ ID NO: 88, 134 и 90 и/или CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 91, 92 и 93.

В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с эпитопом TIGIT человека, который содержит по меньшей мере одну из следующих областей: остатки 53-57, остатки 60-65, остатки 68-70, остатки 72-81, остатки 94-95 и остатки 109-119 из SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с эпитопом TIGIT человека, содержащим остатки 53-57, 60-65, 68-70, 72-81, 94-95 и 109-119 из SEQ ID NO: 31.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, перекрестно блокирующему связывание антитела (или конкурирующему с антителом), которое содержит вариательную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 7 и вариательную область легкой цепи из SEQ ID NO: 8, с TIGIT человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с вариательной областью тяжелой цепи или вариательными легкими цепями из SEQ ID NO: 7-30 или 37-52. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в вариательных областях тяжелых цепей из SEQ ID NO: 7, 9-24 и 37-47 или в вариательных областях легких цепей из SEQ ID NO: 8, 25-30 и 48-52. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены в CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1-3) или в CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 3-6).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, перекрестно блокирующему связывание антитела (или конкурирующему с антителом), которое содержит вариательную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 и вариательную область легкой цепи из SEQ ID NO: 64, с TIGIT человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной из следующих функциональных характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112. В одном варианте осуществления антитело обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с вариательной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 или с вариательной областью легкой цепи из SEQ ID NO: 64. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в вариательной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 или в вариательной области легкой цепи из SEQ ID NO: 64. В другом

варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены в CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 57-59) или в CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 60-62).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, перекрестно блокирующему связывание антитела (или конкурирующему с антителом), которое содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 94 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO: 95, с TIGIT человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик: (i) связывается с TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112. В одном варианте осуществления антитело обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с переменной областью тяжелой цепи из SEQ ID NO: 94 или с переменными легкими цепями из SEQ ID NO: 95. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в переменной области тяжелой цепи из любой из SEQ ID NO: 94 или 124-129, или в переменной области легкой цепи из любой из SEQ ID NO: 95 или 130-133. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены в CDR тяжелой цепи (SEQ ID NOs: 88-90) или в CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 91-93). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 132. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 127 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 130. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 133.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 9-24 и 37-47, и/или переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 25-30 и 48-52. В одном варианте осуществления антитело содержит аминокислотную замену в FR4 тяжелой цепи, где замена выполнена в положении 122 из SEQ ID NO: 9-24 и 37-47, где остаток М заменен на V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W или Y. В одном варианте осуществления антитело содержит две аминокислотные замены в FR4 тяжелой цепи, где замены выполнены в положениях 122 и 123 из SEQ ID NO: 9-24 и 37-47, где остатки М и V заменены на Т и L соответственно.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 9-24 и 37-47, и/или переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 25-30 и 48-52. В одном варианте осуществления антитело содержит аминокислотную замену в FR4 тяжелой цепи, где замена выполнена в положении 122 из SEQ ID NO: 9-24 и 37-47, где остаток М заменен на V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W или Y. В одном варианте осуществления антитело содержит две аминокислотные замены в FR4 тяжелой цепи, где замены выполнены в положениях 122 и 123 из SEQ ID NO: 9-24 и 37-47, где остатки М и V заменены на Т и L соответственно.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 7 или ее вариант, содержащий вплоть до 30 аминокислотных замен, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 8, содержащую вплоть до 12 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 7, содержащую аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из: 6, 9, 12, 15, 16, 17, 23, 25, 37, 39, 40, 43, 44, 45, 48, 67, 68, 70, 71, 79, 81, 83, 87, 88, 92, 94, 119, 122 и 123. В одном варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 7, содержащую аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из: 6, 9, 12, 15, 16, 17, 23, 25, 37, 39, 40, 43, 44, 45, 48, 67, 68, 70, 71, 79, 81, 83, 87, 88, 92, 94, 110, 119, 122 и 123, где аминокислота в положении 6 может представлять собой E или Q, аминокислота в положении 9 может представлять собой P или A, аминокислота в положении 12 может представлять собой V или L, аминокислота в положении 15 может представлять собой S или R, аминокислота в положении 16 может представлять собой Q или E или G, аминокислота в положении 17 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 23 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 25 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 37 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 39 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 40 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 43 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 44 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 45 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 48 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 67 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 68 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 70 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 71 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 79 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 81 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 83 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 87 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 88 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 92 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 94 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 119 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 122 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 123 может представлять собой S или T.

кислота в положении 23 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 25 может представлять собой T или S, аминокислота в положении 37 может представлять собой I или V, аминокислота в положении 39 может представлять собой K или Q, аминокислота в положении 40 может представлять собой F или P, аминокислота в положении 43 может представлять собой N или K, аминокислота в положении 44 может представлять собой K или G, аминокислота в положении 45 может представлять собой M или L, аминокислота в положении 48 может представлять собой M или I, аминокислота в положении 67 может представлять собой I или V, аминокислота в положении 68 может представлять собой S или T, аминокислота в положении 70 может представлять собой T или S, аминокислота в положении 71 может представлять собой R или V, аминокислота в положении 79 может представлять собой F или S, аминокислота в положении 81 может представлять собой Q или K, аминокислота в положении 83 может представлять собой H или S, аминокислота в положении 87 может представлять собой T или A, аминокислота в положении 88 может представлять собой D или A, аминокислота в положении 92 может представлять собой T или V, аминокислота в положении 94 может представлять собой S или Y, аминокислота в положении 110 может представлять собой W, F, Y, I, V или L, аминокислота в положении 119 может представлять собой P или Q, аминокислота в положении 122 может представлять собой M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W или Y, и аминокислота в положении 123 может представлять собой V, T или L. В одном варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 8, содержащую аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из 10, 21, 22, 40, 42, 46, 52, 53, 58, 77, 83, 87, 95 и 106. В одном варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотная последовательность из SEQ ID NO: 8, содержащую аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из 10, 21, 22, 40, 42, 46, 52, 53, 58, 77, 83, 87, 95 и 106, где аминокислота в положении 10 может представлять собой L или S, аминокислота в положении 21 может представлять собой L или I, аминокислота в положении 22 может представлять собой N или T, аминокислота в положении 40 может представлять собой L или P, аминокислота в положении 42 может представлять собой E или K, аминокислота в положении 46 может представлять собой F или L, аминокислота в положении 52 может представлять собой N, S, T, G или D, аминокислота в положении 53 может представлять собой S, N, T, Y или Q, аминокислота в положении 58 может представлять собой I или V, аминокислота в положении 77 может представлять собой G или S, аминокислота в положении 83 может представлять собой V или F, аминокислота в положении 87 может представлять собой F или Y, аминокислота в положении 95 может представлять собой W, F, Y, I, V или L, и аминокислота в положении 105 может представлять собой L или I.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антители или антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему: тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 9 и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 25, где каждая из варибельных цепей может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления изобретения антители может содержать мутации в положениях 27, 48, 67, 71, 83, 110, 122 и 123 из SEQ ID NO: 9. Например, в отношении SEQ ID NO: 9: аминокислота в положении 27 может представлять собой G или S; аминокислота в положении 48 может представлять собой I или M; аминокислота в положении 67 может представлять собой V или I; аминокислота в положении 71 может представлять собой V или R; аминокислота в положении 83 может представлять собой S или H; аминокислота в положении 110 может представлять собой W, F, Y, I, V или L; аминокислота в положении 122 может представлять собой M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W или Y; и аминокислота в положении 123 может представлять собой V, T или L. В другом варианте осуществления антители может содержать мутации в положениях 46, 52, 53, 58 и 95 из SEQ ID NO: 25. Например, в отношении SEQ ID NO: 25, аминокислота в положении 46 может представлять собой L или F; аминокислота в положении 52 может представлять собой N, S, T, G или D, аминокислота в положении 53 может представлять собой S, N, T, Y или Q; аминокислота в положении 58 может представлять собой I или V; аминокислота в положении 58 может представлять собой V или I; и аминокислота в положении 95 может представлять собой W, F, Y, I, V или L.

В одном варианте осуществления изобретение относится к антители или антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с TIGIT человека, содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 94 или ее вариант, содержащий вплоть до 30 аминокислотных замен, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 95 или ее вариант, содержащий вплоть до 18 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления тяжелая цепь содержит вариант аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 94, содержащий аминокислотные замены в одном или нескольких положений, выбранных из группы, состоящей из: 5, 9, 11, 12, 16, 20, 38, 40, 44, 56, 57, 61, 62, 65, 67, 68, 72, 74, 76, 79, 85, 87, 89, 91, 92, 104 и 111. В одном варианте осуществления тяжелая цепь содержит вариант аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 94, содержащий аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из 5, 9, 11, 12, 16, 20, 38, 40, 44, 56, 57, 61, 62, 65, 67, 68, 72, 74, 76, 79, 85, 87, 89, 91, 92, 104 и 111, где аминокислота в положении 5 может представлять собой Q или V, аминокислота в положении 9 может представлять собой P или A, аминокислота в положении 11 может представлять собой V или L, аминокислота в

83, где аминокислота в положении 43 может представлять собой S, A или V, аминокислота в положении 50 может представлять собой N, A, Y, W, S, T, I или V, аминокислота в положении 51 может представлять собой A, N, I, L, T или V, аминокислота в положении 70 может представлять собой Q или D, и аминокислота в положении 83 может представлять собой F или V.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является выделенным.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой рекомбинантное антитело.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может содержать вариabельную область тяжелой цепи, состоящую из: (a) любой из вариabельных областей тяжелых цепей, описанных выше, и (b) лидерного пептида (например, лидерного пептида из SEQ ID NO: 53). В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может содержать вариabельную область легкой цепи, состоящую из: (a) любой из вариabельных областей легких цепей, описанных выше, и (b) лидерного пептида (например, лидерного пептида из SEQ ID NO: 54).

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой антитело, содержащее любую из вариabельных тяжелых цепей, описанных выше, и любой константный домен тяжелой цепи человека. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению относится к изотипу IgG и содержит константный домен тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO: 86) или его вариант, где вариант содержит вплоть до 20 модифицированных аминокислотных замен. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой антитело, содержащее константный домен тяжелой цепи IgG1 человека, где константный домен содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 86. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека, где константный домен IgG1 является афукозилированным. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека или его вариант, где вариант содержит вплоть до 20 модифицированных аминокислотных замен. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека, где аминокислота в положении 228 (с использованием системы нумерации EU) заменена с Ser на Pro. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 55.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может содержать любую из вариabельных легких цепей, описанных выше, и константный домен легкой цепи человека. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен легкой цепи каппа человека или его вариант, где вариант содержит вплоть до 20 модифицированных аминокислотных замен. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен легкой цепи лямбда человека или его вариант, где вариант содержит вплоть до 20 модифицированных аминокислотных замен. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен легкой цепи каппа человека, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 56.

В одном варианте осуществления антитело против TIGIT по изобретению содержит полную тетрамерную структуру, обладающую двумя легкими цепями и двумя тяжелыми цепями, где каждая легкая цепь содержит вариabельную область, содержащую SEQ ID NO: 132, и легкую цепь каппа человека (SEQ ID NO: 56); и каждая тяжелая цепь содержит: вариabельную область, содержащую SEQ ID NO: 128, константную область IgG1 человека (SEQ ID NO: 86).

В одном варианте осуществления антитело против TIGIT по изобретению содержит полную тетрамерную структуру, обладающую двумя легкими цепями и двумя тяжелыми цепями, где каждая легкая цепь содержит вариabельную область, содержащую SEQ ID NO: 130, и легкую цепь каппа человека (SEQ ID NO: 56); и каждая тяжелая цепь содержит: вариabельную область, содержащую SEQ ID NO: 127, константную область IgG1 человека (SEQ ID NO: 86).

В одном варианте осуществления антитело против TIGIT по изобретению содержит полную тетрамерную структуру, обладающую двумя легкими цепями и двумя тяжелыми цепями, где каждая легкая цепь содержит вариabельную область, содержащую SEQ ID NO: 133 и легкую цепь каппа человека (SEQ ID NO: 56); и каждая тяжелая цепь содержит: вариabельную область, содержащую SEQ ID NO: 128, константную область IgG1 человека (SEQ ID NO: 86).

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может являться конъюгированным по меньшей мере с одним лекарственным средством. В одном варианте осуществления, где лекарственное средство содержит вторичное антитело или его фрагмент, иммуномодулятор, гормон, цитотоксическое средство, фермент, радиоактивный изотоп, вторичное антитело конъюгировано по меньшей мере с одним иммуномодулятором, ферментом, радиоактивной меткой, гормоном, бессмысловым олигонуклеотидом или цитотоксическим средством или их сочетанием.

Изобретение относится также к выделенным полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NOs: 1-30, 37-52, 57-83 или 88-151 или фрагмент любой из указанных последовательностей.

Изобретение относится также к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим любое из антител против TIGIT или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из полипептидов из SEQ ID NO: 1-30, 37-52, 57-64 или 88-133, где указанные полипептиды могут, необязательно, содержать лидерную последовательность.

Изобретение относится также к экспрессирующим векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из полипептидов из SEQ ID NO: 1-30, 37-52, 57-83 или 88-167 (где указанные полипептиды могут, необязательно, содержать лидерную последовательность). Эти выделенные нуклеиновые кислоты и содержащие их экспрессирующие векторы можно использовать для экспрессии антител по изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов в рекомбинантных клетках-хозяевах. Таким образом, изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из полипептидов из SEQ ID NO: 1-30, 37-52, 57-83 или 88-151 (где указанные полипептиды могут, необязательно, содержать лидерную последовательность). В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомяка. В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку дрожжей, например клетку-хозяина *Pichia* или клетку-хозяина *Pichia pastoris*.

Изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В одном варианте осуществления композиция содержит дополнительное лекарственное средство. В одном варианте осуществления дополнительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из антитела против PD1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против VISTA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против BTLA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIM3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против HVEM или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD27 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD28 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против GITR или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ICOS или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT4 или его антигенсвязывающий фрагмент; и антитела против ILT5 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против 4-1BB антитело или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления антитело против PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и ниволумаба или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, 79, 80, 81, 82, 83 или 140; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 141; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 74, 75, 76, 77, 78 или 142. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 или 147; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

тельность из SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 58; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 59; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 60; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 61; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 62. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 134 или 135; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128, и вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 132. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 127, и вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 130. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий: вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128, и вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 133.

Изобретение относится также к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества антитела против TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, необязательно, в сочетании с дополнительным лекарственным средством или терапевтической процедурой. В одном варианте осуществления субъект, подвергаемый лечению, представляет собой субъекта-человека. В одном варианте осуществления дополнительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из антитела против PD1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против VISTA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против BTLA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIM3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против HVEM или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD27 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD28 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против GITR или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ICOS или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT5 или его антигенсвязывающий фрагмент; и антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления антитело против PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и ниволумаба или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области

114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 или 148; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 58; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 59; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 60; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 61; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 62. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 134 или 135; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93.

Изобретение относится также к способу увеличения активности иммуноцитов, включающему введение иммуноцитов в контакт с любым из антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу увеличения активности иммуноцитов, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В одном варианте осуществления способ используют для: лечения злокачественной опухоли, лечения инфекции или инфекционного заболевания, или в качестве адъюванта для вакцин. В одном варианте осуществления увеличение активности иммуноцитов можно детектировать посредством измерения пролиферации иммуноцитов. Например, увеличение активности Т-клеток можно детектировать посредством измерения пролиферации Т-клеток. В одном варианте осуществления увеличение активности иммуноцитов можно детектировать посредством измерения активации Т-клеток *ex vivo* в образце, полученном от субъекта. В одном варианте осуществления увеличение активности Т-клеток определяют посредством: (i) измерения результатов реакции смешанной культуры лимфоцитов или прямой стимуляции mAb против CD3 передачи сигнала Т-клеточного рецептора (TCR) для индукции продукции цитокинов, выбранных из группы, состоящей из: IL-2, TNF α , IL-17, IFN γ , IL-1 β , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 и IL-13; (ii) измерения индуцированной SEB продукции одного или нескольких цитокинов, выбранный из группы, состоящей из: IL-2, TNF α , IL-17, IFN γ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 и IL-13; или (iii) измерения индуцированной ТТ продукции цитокина, выбранного из группы, состоящей из: IL-2, TNF α , IL-17, IFN γ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 и IL-13. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, 79, 80, 81, 82, 83 или 140; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 141; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 74, 75, 76, 77, 78 или 142. В одном варианте осу-

ществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 или 147; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 или 148; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 58; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 59; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 60; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 61; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 62. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 134 или 135; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93.

Изобретение относится также к способу лечения злокачественной опухоли или инфекционного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества антитела-антагониста против TIGIT и антитела-антагониста против PD1, где антитело против TIGIT обладает усиленной эффекторной функцией по сравнению с исходным антителом. Как применяют в настоящем документе, "исходное антитело" относится к антителу, обладающему Fc-областью дикого типа и/или гликозилированием дикого типа (т.е. паттерном гликозилирования, возникающим в результате экспрессии полипептида в немодифицированной клетке-хозяине млекопитающего). Эффекторную функцию исходного антитела можно усиливать посредством мутагенеза его Fc-области или посредством изменения его гликозилирования (как более подробно обсуждают ниже). В одном варианте осуществления антитело против PD1 вводят до введения исходного антитела. В одном варианте осуществления антитело против PD1 вводят за 4-10 суток до введения антитела против TIGIT. В одном варианте осуществления предварительная обработка антителом против PD1 может модулировать иммунциты, что приводит к усиленной опосредованной Fc функции антител против TIGIT. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT содержит константный домен IgG1 человека. В одном варианте осуществления обработка антителами против TIGIT и антителами против PD1 не приводит к истощению Treg. В одном варианте осуществления антитело против PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: пембролизумаба и ниволумаба. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3 (iv) CDR1 ва-

риабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 134 или 135; (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90 (iv) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93.

Изобретение относится также к способу лечения злокачественной опухоли или инфекционного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества антитела-антагониста против TIGIT и антитела-антагониста против PD1, где антитело против TIGIT является афукозилированным. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3 (iv) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит: (i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 89, 134 или 135; (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90 (iv) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88; (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 134; (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 90; (iv) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 91; (v) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 92; и (vi) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93.

Изобретение относится также к способу увеличения противоопухолевой активности антитела против TIGIT, включающему получение исходного антитела против TIGIT и усиление эффекторной функции исходного антитела против TIGIT, где активность полученного антитела против TIGIT увеличена по сравнению с исходным антителом против TIGIT. Как применяют в настоящем документе, "исходное антитело" относится к антителу, обладающему Fc-областью дикого типа и/или гликозилированием дикого типа (т.е. паттерном гликозилирования, возникающим в результате экспрессии полипептида в немодифицированной клетке-хозяине млекопитающего). Эффекторную функцию исходного антитела можно усиливать посредством мутагенеза его Fc-области или посредством изменения его гликозилирования, например, делая антитело афукозилированным (как более подробно обсуждают ниже). В одном варианте осуществления эффекторную функцию исходного антитела против TIGIT усиливают посредством мутагенеза в Fc-области исходного антитела против TIGIT. В другом варианте осуществления эффекторную функцию исходного антитела против TIGIT усиливают посредством удаления остатков фукозы из антитела, или посредством экспрессии антитела в клетке-хозяине, генетически модифицированной для удаления активности фермента, добавляющего фукозу к гликопротеинам.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано связывание антитела 14A6 с TIGIT человека и макака-резуса (экспрессированными в клетках CHO-K1);

на фиг. 2 - связывание антитела 28H5 с TIGIT человека и макака-резуса (экспрессированными в клетках CHO-K1);

на фиг. 3 показано, что антитела 14A6 и 28H5 блокируют взаимодействие hCD155 с hTIGIT, как определено посредством анализа блокирования ELISA на основе клеток;

на фиг. 4 - связывание антитела 31C6 с TIGIT человека и макака-резуса (экспрессированными в клетках CHO-K1) и показано также, что антитело 31C6 блокирует взаимодействие hCD155 с hTIGIT;

на фиг. 5 - активность антител 14A6 и 28H5 в анализе Т-клеток *in vitro*;

на фиг. 6 - активность антител 14A6 и 31C6 в анализе Т-клеток *in vitro*;

на фиг. 7 - экспрессия TIGIT, CD226, CD155 и CD96 в линиях первичных Т-клеток человека. На сутки 3 для клона BC4-49 показана наивысшая повышающая регуляция TIGIT (отрицательного) и понижающая регуляция CD226 (положительного);

на фиг. 8A и 8B - активность различных антител против TIGIT в анализе Т-клеток *in vitro*. Это показывает, что MBS43 и антитела против TIGIT 14A6, 37D10 и 28H5 восстанавливают ответы IFN γ в первичных Т-клетках человека;

на фиг. 9A-9D - эффект параллельного введения антитела крысы против TIGIT мыши (GIGD7) и антитела против PD-1 мыши по сравнению с группами лечения монотерапией на противоопухолевый ответ мышей с имплантацией линии клеток CT26 (n=10/группу). Лечение начинали, когда опухоли достигали 75-115 мм³;

на фиг. 10 - эффект изотипа Fc на противоопухолевую активность антитела против TIGIT (18G10) в комбинации с антителом против PD-1 в модели опухоли на животных;

на фиг. 11A-11C - эффект изотипа Fc на противоопухолевую активность антитела против TIGIT (18G10) в комбинации с антителом против PD-1 в модели опухоли на животных;

на фиг. 12 - эффект изотипа Fc на противоопухолевую активность антитела против TIGIT (11A11) в комбинации с антителом против PD-1 в модели опухоли на животных;

на фиг. 13A-13C - эффект изотипа Fc на противоопухолевую активность антитела против TIGIT (11A11) в комбинации с антителом против PD-1 в модели опухоли на животных;

на фиг. 14 - тепловая карта, показывающая области TIGIT человека, сильно или слабо защищенные от дейтерирования посредством связывания антитела 14A6. Аминокислотная последовательность, показанная на тепловой карте, соответствует SEQ ID NO: 87;

на фиг. 15 - тепловая карта, показывающая области TIGIT человека, сильно или слабо защищенные от дейтерирования посредством связывания антитела 31C6. Аминокислотная последовательность, показанная на тепловой карте, соответствует SEQ ID NO: 87;

на фиг. 16 - эффект различных гуманизированных клонов 31C6 по сравнению с химерными и исходными антителами в функциональном анализе модифицированных Т-клеток;

на фиг. 17 - эффект различных гуманизированных клонов 31C6 по сравнению с химерными антителами в функциональном анализе первичных Т-клеток.

Подробное описание

Сокращения.

На всем протяжении подробного описания и примеров по изобретению используют следующие сокращения:

ADCC	Антителозависимая клеточная цитотоксичность
CDC	Комплементзависимая цитотоксичность
CDR	Определяющая комплементарность область в переменных областях иммуноглобулинов, определенная с использованием системы нумерации Kabat
CHO	яичник китайского хомяка
ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ
FR	Каркасная область антитела: переменные области иммуноглобулинов, исключая области CDR.
HRP	Пероксидаза хрена
IFN	Интерферон
IC50	Концентрация, приводящая к 50% ингибированию
IgG	Имуноглобулин G
Kabat	Система выравнивания и нумерации иммуноглобулинов, введенная Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)
mAb или Mab, или MAb	Моноклональное антитело
SEB	Энтеротоксин В стафилококка
TT	Токсиод столбняка
Область V	Участок цепей IgG, который является переменным по последовательности между различными антителами. Он продолжается до остатка по Kabat 109 в легкой цепи и 113 в тяжелой цепи.
VH	Переменная область тяжелой цепи иммуноглобулинов
VK	Переменная область легкой цепи иммуноглобулина каппа

Определения.

Чтобы изобретение можно было легче понять, конкретные технические и научные термины конкретно определены ниже. Если конкретно не определено иначе, в другом месте этого документа все другие технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, обладают значением, общепринятым для специалиста в области, к которой относится это изобретение.

Как применяют в настоящем документе, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов включают ссылки на их соответствующее множественное число, если из контекста явно не следует иначе.

"Введение" и "лечение", как их применяют к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, относится к приведению в контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического средства или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клеток включает приведение реагента в контакт с клеткой, а также приведение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клеткой. "Введение" и "лечение" означает также обработки *in vitro* и *ex vivo*, например, клеток, реагентом, диагностическим средством, связывающим соединением или посредством других клеток.

"Лечить" или "лечение" означает введение лекарственного средства, такого как композиция, содержащая любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, внутренне или наружно, субъекту или пациенту, обладающему одним или несколькими симптомами заболевания, или, как подозревают, страдающему заболеванием, терапевтической активностью против которого обладает средство. Как правило, средство вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или нескольких симптомов заболевания у подвергаемого лечению субъекта или в популяции, посредством либо индукции регрессии либо ингибирования прогрессирования такого симптома(симптомов) до любой под-

дающейся клиническому измерению степени. Количество лекарственного средства, которое является эффективным для облегчения любого конкретного симптома заболевания, может меняться в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст и масса пациента и способность лекарственного средства вызывать желательный ответ у субъекта. Облегчен ли симптом заболевания, можно оценивать посредством любого клинического измерения, обычно используемого терапевтами или другими квалифицированными медицинскими работниками для оценки тяжести или статуса прогрессирования этого симптома.

TIGIT.

Термин TIGIT включает TIGIT человека, TIGIT яванского макака и TIGIT макака-резуса, а также их фрагменты, такие как их зрелые фрагменты, лишённые сигнального пептида. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность TIGIT человека содержит аминокислотную последовательность, описанную аминокислотными остатками 25-244 из номера доступа в Genbank NP_776160.2 (SEQ ID NO: 31) (аминокислотные остатки 1-24 из SEQ ID NO: 31 соответствуют лидерному пептиду).

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность TIGIT яванского макака, например *Macaca fascicularis*, содержит аминокислотную последовательность, описанную в (SEQ ID NO: 32); также см. номер доступа в GeneBank XP_005548157. Аминокислотная последовательность TIGIT макака-резуса является идентичной аминокислотой последовательности TIGIT яванского макака (аминокислотные остатки 1-24 из SEQ ID NO: 32 соответствуют лидерному пептиду).

Антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, связывающимся с TIGIT человека, и к применениям таких антител или фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT являются выделенными.

Как применяют в настоящем документе, антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с TIGIT человека. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые "специфически связываются с TIGIT человека", представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с TIGIT человека с KD приблизительно 1 нМ или более высокой аффинностью (например, 1 нМ-2 пМ, 1 нМ, 100, 10 или 2 пМ), но не связываются с другими белками, лишёнными этой последовательности. Например, антитело, которое "специфически связывается" с TIGIT человека, не связывается с CD226 человека, CD155 человека и CD112 человека. В качестве дополнительного примера антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с TIGIT человека, могут связываться с меченой FLAG® формой TIGIT человека, но не связываются с другими мечеными FLAG® белками, лишёнными эпитопов TIGIT человека. В одном варианте осуществления антитело по изобретению, которое специфически связывается с TIGIT человека, обладает также перекрестной реакционной способностью по отношению к TIGIT яванского макака и макака-резуса. Как применяют в настоящем документе "перекрестная реакционная способность" относится к способности антитела вступать в реакцию с гомологичным белком из других видов. Связывается ли антитело специфически с TIGIT человека, можно определять с использованием любого анализа, известного в данной области. Примеры анализов, известных в данной области для определения аффинности связывания, включают поверхностный плазмонный резонанс (например, BIACORE) или сходный способ (например, KinExa или OCTET).

Настоящее изобретение относится к антителам против TIGIT и к способам их применения. Как применяют в настоящем документе, термин "антитело" относится к любой форме антитела, проявляющей желательную биологическую активность. Таким образом, его используют в самом широком смысле, и он конкретно охватывает, но без ограничения, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела, содержащие две легкие цепи и две тяжелые цепи), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), гуманизированные антитела, полностью человеческие антитела, химерные антитела и верблюжьи однодоменные антитела.

Настоящее изобретение относится к не относящимся человеку (например, из мышей и грызунов) исходным антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам и к способам их применения. Эти антитела можно модифицировать для предназначенного применения, например, гуманизация антитела для применения в качестве терапевтического антитела или фрагмента для человека.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим фрагментам против TIGIT и к способам их применения. Как применяют в настоящем документе, если не указано иначе, "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относится к антигенсвязывающим фрагментам антител, т.е. к фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связываемым полноразмерным антителом, например, к фрагментам, которые сохраняют одну или несколько областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но без ограничения, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител, например, sc-Fv; нанотела и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител.

Настоящее изобретение относится к фрагментам Fab против TIGIT и к способам их применения.

"Фрагмент Fab" состоит из одной легкой цепи, и C_{H1} и переменных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может формировать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. "Фрагмент Fab" может представлять собой продукт расщепления антитела папаином.

Изобретение относится к антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим Fc-область, и к способам их применения. Область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C_{H1} и C_{H2} антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе посредством двух или более дисульфидных связей и посредством гидрофобных взаимодействий доменов C_{H3} .

Настоящее изобретение относится к фрагментам Fab' против TIGIT и к способам их применения. "Фрагмент Fab'" содержит одну легкую цепь и часть или фрагмент одной тяжелой цепи, содержащие домен V_H и домен C_{H1} , а также область между доменами C_{H1} и C_{H2} , так что межцепевая дисульфидная связь может формироваться между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' с формированием молекулы $F(ab')_2$.

Настоящее изобретение относится к фрагментам $F(ab')_2$ против TIGIT и к способам их применения. "Фрагмент $F(ab')_2$ " содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2} , так что межцепевая дисульфидная связь формируется между двумя тяжелыми цепями. Фрагмент $F(ab')_2$, таким образом, состоит из двух фрагментов Fab', удерживаемых вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями. "Фрагмент $F(ab')_2$ " может представлять собой продукт расщепления антитела пепсином.

Настоящее изобретение относится к фрагментам антител против TIGIT Fv и к способам их применения. "Область Fv" содержит переменные области как из тяжелых, так и из легких цепей, но лишена константных областей.

Настоящее изобретение относится к фрагментам scFv против TIGIT и к способам их применения. Термин "одноцепочечное Fv" или "scFv" антитело относится к фрагментам антитела, содержащим домены V_H и V_L антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L , который позволяет scFv формировать желательную структуру для связывания антигена. Обзор scFv, см. в Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. Также см. публикацию международной патентной заявки № WO 88/01649 и патенты США № 4946778 и 5260203.

Настоящее изобретение относится к доменным антителам против TIGIT и к способам их применения. "Доменное антитело" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более областей V_H ковалентно соединены с помощью пептидного линкера для получения двухвалентного доменного антитела. Две области V_H двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на одинаковые или различные антигены.

Настоящее изобретение относится к двухвалентным антителам против TIGIT и к способам их применения. "Двухвалентное антитело" содержит два антигенсвязывающих участка. В некоторых случаях два участка связывания обладают одинаковыми антигенными специфичностями. Однако двухвалентные антитела могут являться биспецифическими (см. ниже).

Настоящее изобретение относится к верблюжьим однодоменным антителам против TIGIT и к способам их применения. В конкретных вариантах осуществления антитела в настоящем документе включают также верблюжьи однодоменные антитела. См., например, Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmann et al. (1999) J. Immunol. Способы 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; патент США № 6005079). В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к однодоменным антителам, содержащим два домена V_H с такими модификациями, что формируются однодоменные антитела.

Настоящее изобретение относится к диателам против TIGIT и к способам их применения. Как применяют в настоящем документе, термин "диатела" обозначает малые фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими участками, где фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H - V_L или V_L - V_H). Посредством использования линкера, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, домены вынуждают спариваться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих участка. Диатела более полно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161; и Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448. Общий обзор модифицированных вариантов антител см. в Holliger and Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

Как правило, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, модифицированные каким-либо образом, могут сохранять по меньшей мере 10% от его активности (по сравнению с исходным антителом), когда такая активность выражена на молярной основе. Предпочтительно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению сохраняют по меньшей мере 20, 50, 70, 80, 90, 95 или 100% или более от аффинности связывания TIGIT исходным антителом. Предусматривают также, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может включать консервативные или не-

консервативные аминокислотные замены (обозначаемые как "консервативные варианты" или "функционально консервативные варианты" антитела), которые существенно не изменяют его биологическую активность.

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам и к способам их применения. "Выделенные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты являются, по меньшей мере, частично свободными от других биологических молекул из клеток или культур клеток, в которых они продуцированы. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы, или другие материалы, такие как клеточный дебрис и среда для выращивания. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут, кроме того, являться, по меньшей мере, частично свободными от компонентов экспрессирующей системы, таких как биологические молекулы из клетки-хозяина или из среды для ее выращивания. Как правило, термин "выделенный" не предназначен для обозначения полного отсутствия таких биологических молекул или отсутствия воды, буферов или солей, или компонентов фармацевтического состава, содержащего антитело или фрагменты.

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам, а также к моноклональным композициям, содержащим множество выделенных моноклональных антител. Термин "моноклональные антитела", как применяют в настоящем документе, относится к популяции по существу гомогенных антител, т.е. молекулы антител, содержащиеся в популяции, являются идентичными по аминокислотной последовательности, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. В отличие от этого общепринятые (поликлональные) препараты антител, как правило, включают множество различных антител, обладающих различными аминокислотными последовательностями в их варибельных доменах, в частности в их CDR, которые часто являются специфическими для различных эпитопов. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела, как полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с настоящим изобретением можно получать способом гибридомы, впервые описанным Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, или их можно получать способами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" можно выделять также из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных в Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628 и Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, например. Также см. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

Настоящее изобретение относится к химерным антителам против TIGIT (например, человеческий константный домен/мышинный варибельный домен) и к способам их применения. Как применяют в настоящем документе, "химерное антитело" представляет собой антитело, обладающее варибельным доменом из первого антитела и константным доменом из второго антитела, где первое и второе антитела происходят из различных видов. (Патент США № 4816567; и Morrison et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855). Как правило, варибельные домены получают из антитела из экспериментального животного ("исходное антитело"), такого как грызун, и последовательности константного домена получают из антител человека, так что полученное химерное антитело с меньшей вероятностью вызывает неблагоприятный иммунный ответ у субъекта-человека, чем исходное (например, мышинное) антитело.

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам (например, крысиным или мышинным антителам, которые были гуманизированы) и к способам их применения. Изобретение относится к гуманизированному варианту антитела 14A6 (содержащему SEQ ID NO: 7 и 8), антитела 28H5 (содержащему SEQ ID NO: 63 и 64) и антитела 31C6 (содержащему SEQ ID NO: 94-95). Как применяют в настоящем документе, термин "гуманизированное антитело" относится к формам антител, содержащим последовательности как из антител человека, так и из не относящихся к человеку антител (например, мыши или крысы). Как правило, гуманизированное антитело может содержать, по существу, все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух, варибельных доменов, в которых все или в основном все из гиперварибельных петель соответствуют гиперварибельным петлям из не относящегося к человеку иммуноглобулина, и все или в основном все из каркасных (FR) областей представляют собой каркасные области из последовательностей иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело может, необязательно, содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина человека (Fc).

Как правило, основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, где каждая пара обладает одной "легкой" (приблизительно 25 кДа) и одной "тяжелой" цепью (приблизительно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи содержит варибельную область приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, преимущественно ответственных за узнавание антигена. Карбокси-концевая часть тяжелой цепи может определять константную область, преимущественно ответственную за эффекторную функцию. Как правило, человеческие легкие цепи классифицируют как легкие цепи каппа и ламбда. Кроме того, человеческие тяжелые цепи, как правило, классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon, и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Внутри легких и тяжелых цепей варибельные и

константные области соединены посредством области "J" из приблизительно 12 или более аминокислот, где тяжелая цепь содержит также область "D" из приблизительно 10 дополнительных аминокислот. См. в общем, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989).

Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи формируют участок связывания антитела. Таким образом, как правило, интактное антитело обладает двумя участками связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител два участка связывания, как правило, являются одинаковыми.

Как правило, вариабельные домены как тяжелых, так и легких цепей содержат три гипервариабельные области, называемые также определяющими комплементарность областями (CDR), локализованные внутри относительно консервативных каркасных областей (FR). CDR, как правило, выровнены посредством каркасных областей, что позволяет связывание со специфическим эпитопом. Как правило, от N-конца до C-конца, вариабельные домены как легких, так и тяжелых цепей содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому домену, как правило, соответствует определениям из *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Kabat et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Rabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Rabat et al., (1977) *J. Biol. Chem.*, 252:6609-6616; Chothia et al., (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 или Chothia et al., (1989) *Nature* 342:878-883.

Как применяют в настоящем документе, термин "гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (т.е. CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в вариабельном домене легкой цепи и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в вариабельном домене тяжелой цепи). См. Rabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела по последовательности); также см. Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (определение областей CDR антитела по структуре). Как применяют в настоящем документе, термин "каркасные" или "FR" остатки относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельной области, определенных в настоящем документе как остатки CDR.

"Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" или "выделенный полинуклеотид" обозначает ДНК или РНК геномного, мРНК, кДНК, или синтетического происхождения, или некоторое их сочетание, не ассоциированные со всем или частью полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид обнаружен в природе, или сцепленные с полинуклеотидом, с которым он не сцеплен в природе. Для целей по этому описанию следует понимать, что "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность, не включает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" указанные последовательности нуклеиновой кислоты, могут включать, в дополнение к указанным последовательностям, кодирующие последовательности для вплоть до десяти или даже вплоть до двадцати или более других белков, или их частей или фрагментов, или могут включать функционально связанные регуляторные последовательности, контролирующие экспрессию кодирующей области указанных последовательностей нуклеиновой кислоты, и/или могут включать векторные последовательности.

Фраза "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для прокариот, например, включают промотор, необязательно, последовательность оператора и участок связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота или полинуклеотид является "функционально связанной", когда ее помещают в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для препоследовательности или секреторного лидера является функционально связанной с ДНК для полипептида, если он экспрессируется в форме пребелка, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер является функционально связанным с кодируемой последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосомы является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчать трансляцию. Как правило, но не всегда, "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными и в случае секреторного лидера смежными и в фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны являться смежными. Связывание проводят посредством лигирования в удобных участках рестрикции. Если таких участков не существует, синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры используют в соответствии с общепринятой практикой.

Как применяют в настоящем документе, выражения "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используют взаимозаменяемо, и все такие определения включают потомство. Таким образом, слова "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную рассматриваемую клетку и происходящие из нее культуры независимо от количества переносов. Также следует понимать, что не все потомство будет обладать точно идентичным содержанием ДНК из-за преднамеренных или спонтанных мутаций. Включено мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активно-

стью, по которым проводили скрининг исходно трансформированных клеток. Когда предусмотрены отличные определения, это ясно из контекста.

Как применяют в настоящем документе, "зародышевая последовательность" относится к последовательности из неперегруппированных последовательностей ДНК иммуноглобулинов. Можно использовать любой подходящий источник неперегруппированных последовательностей иммуноглобулинов.

Зародышевые последовательности человека можно получать, например, из баз данных зародышевых последовательностей JOINSOLVER на веб-сайте National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases of the United States National Institutes of Health. Зародышевые последовательности мыши можно получать, например, как описано в Giudicelli et al. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33 :D256-D261.

Физические и функциональные свойства иллюстративных антител против TIGIT.

Настоящее изобретение относится к антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам, обладающим указанными структурными и функциональными признаками, и к способам применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов в лечении или предотвращении заболеваний (например, злокачественной опухоли или инфекционного заболевания).

"Антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению" включает любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обсуждаемый в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 или гуманизированные варианты этих антител, описанные в табл. 4) или их вариант (например, вариант последовательности или функциональный вариант); любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие любую одну или несколько из CDR, указанных в табл. 4; любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом в TIGIT человека, что и антитела, обсуждаемые в настоящем документе (например, 14A6, 28H5 или 31C6); и любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые перекрестно блокируют (частично или полностью) связывание с TIGIT антитела, обсуждаемого в настоящем документе, или связывание которых с TIGIT перекрестно заблокировано (частично или полностью) антителом, обсуждаемым в настоящем документе (например, 14A6, 28H5 или 31C6).

Перекрестное блокирование антител и их антигенсвязывающих фрагментов можно идентифицировать на основании их способности к перекрестной конкуренции с антителом по изобретению в стандартных анализах связывания (например, ВIACore, ELISA, проточная цитометрия). Например, можно использовать стандартные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок TIGIT (например, TIGIT человека) иммобилизуют на планшете, одно из антител подвергают флуоресцентному мечению, и оценивают способность немеченых антител конкурировать за связывание с меченым антителом. Дополнительно или альтернативно, можно использовать анализ ВIACore для оценки способности антител к перекрестной конкуренции. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание другого антитела (например, антитела 14A6 или 28H5 или 31C6) с TIGIT (например, TIGIT человека) показывает, что тестируемое антитело может конкурировать с другим антителом (например, 14A6 или 28H5 или 31C6) за связывание с TIGIT (например, TIGIT человека) и таким образом, может, в некоторых случаях, связываться с тем же эпитопом на TIGIT (например, TIGIT человека), что и антитело 14A6 или 28H5 или 31C6, или с перекрывающимся эпитопом.

Как указано выше, антитела и фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов против TIGIT по настоящему изобретению, также составляют часть настоящего изобретения. Кроме того, антитела, которые связываются с эпитопом, перекрывающимся с эпитопом, связываемым любым из антител против TIGIT по изобретению, также составляют часть настоящего изобретения. Существует несколько способов, доступных для картирования антитела на антигенах-мишенях, включая: Н/D-Ex масс-спектрометрию, рентгеновскую кристаллографию, анализ рерскап и сайт-направленный мутагенез. Например, HDX (водородно-дейтериевый обмен) в сочетании с протеолизом и масс-спектрометрией можно использовать для определения эпитопа антитела на специфическом антигене Y. HDX-MS основана на точном измерении и сравнении степени включения дейтерия антигеном при инкубации с D₂O отдельно и в присутствии антитела против него в различные временные интервалы. Дейтерий обменивается с водородом на амидном остове белков в экспонированных областях, в то время как области антигена, связанные с антителом, защищены, и для них показан меньший обмен или отсутствие обмена после анализа протеолитических фрагментов посредством LC-MS/MS. Пример 9 иллюстрирует применение HDX для картирования эпитопа, связываемого антителом 14A6.

Имуноглобулиновые цепи антител против TIGIT по изобретению, а также их CDR, включают, в качестве неограничивающих примеров, описанные в табл. 4 (SEQ ID NO: 1-30, 37-52, 57-83 или 88-167). Настоящее изобретение относится к любому полипептиду, содержащему аминокислотные последовательности или состоящему из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 1-30, 37-52, 57-83 или 88-167, и рекомбинантным нуклеотидам, кодирующим такие полипептиды.

Объем настоящего изобретения включает выделенные антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты (например, гуманизированные антитела), содержащие вариант иммуноглобулиновой цепи, указанной в настоящем документе, например любой из SEQ ID NO: 7-30, 37-52, 63-64, 94-95 или 124-133; где вариант обладает одним или несколькими из следующих свойств: (i) связывает TIGIT человека; (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует

связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

В других вариантах осуществления изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с TIGIT человека (например, гуманизированные антитела) и обладают доменами V_L и доменами V_H по меньшей мере с 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7-30, 37-52, 63-64, 94-95 или 124-133; где вариант обладает желательным связыванием и свойствами, например (i) связывает TIGIT человека с значением KD от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET); (ii) вступает в перекрестную реакцию с TIGIT яванского макака и макака-резуса; (iii) блокирует связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека; (iv) увеличивает активацию Т-клеток; (v) стимулирует продукцию IL-2 и IFN γ антигенспецифическими Т-клетками; (vi) блокирует индукцию супрессии активации Т-клеток, индуцированную лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112.

"Консервативно модифицированные варианты" или "консервативная замена" относится к заменам аминокислот в белке на другие аминокислоты, обладающие сходными характеристиками (например, рядом, размером боковых цепей, гидрофобностью/гидрофильностью, конформацией и жесткостью, и т.д.), так что изменения часто можно осуществлять без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области известно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в не являющихся необходимыми областях полипептида существенно не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th 2Ed.)). Кроме того, замены на структурно или функционально сходные аминокислоты с меньшей вероятностью нарушают биологическую активность. Иллюстративные консервативные замены указаны в табл. 1.

Таблица 1. Иллюстративные консервативные аминокислотные замены

Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
Исходный остаток	Консервативная замена
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Функционально консервативные варианты антител по изобретению также включены в настоящее изобретение. "Функционально консервативные варианты", как применяют в настоящем документе, относятся к антителам или фрагментам, в которых один или несколько аминокислотных остатков заменены без изменения желательного свойства, такого как аффинность и/или специфичность для антигена. Такие варианты включают, но без ограничения, замену аминокислоты на обладающую сходными свойствами, такие как консервативные аминокислотные замены из табл. 1. Представлены также выделенные полипептиды, содержащие домены V_L антител против TIGIT по изобретению (например, SEQ ID NO: 8, 25-30 и 48-52), и выделенные полипептиды, содержащие домены V_H (например, SEQ ID NO: 7, 9-24 и 37-47) антител против TIGIT по изобретению, содержащие вплоть до 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных замен. Представлены также выделенные полипептиды, содержащие домены V_L антител против TIGIT по изобретению (например, SEQ ID NO: 64) и выделенные полипептиды, содержащие домены V_H (например, SEQ ID NO: 63) антител против TIGIT по изобретению, содержащие вплоть до 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных замен. Представлены также выделенные полипептиды, содержащие домены V_L антител против TIGIT по изобретению (напри-

мер, SEQ ID NO: 95 и 130-133) и выделенные полипептиды, содержащие домены V_H (например, SEQ ID NO: 94 и 124-129) антител против TIGIT по изобретению, содержащие вплоть до 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных замен.

В другом варианте осуществления представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с TIGIT и обладают доменами V_L и доменами V_H по меньшей мере с 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80 или 75% идентичностью последовательности с одним или несколькими из доменов V_L или доменов V_H , описанных в настоящем документе, и обладают специфическим связыванием с TIGIT. В другом варианте осуществления связывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат домены V_L и V_H (с сигнальной последовательностью и без), содержащие вплоть до 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных замен, и обладают специфическим связыванием с TIGIT.

Полинуклеотиды и полипептиды.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к полинуклеотидам, кодирующим любые из полипептидов или иммуноглобулиновых цепей антител против TIGIT и их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. Например, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим аминокислоты, описанные в SEQ ID NO: 1-30, 37-52, 57-83 и 88-167, а также к полинуклеотидам, гибридирующимся с ними, а также к любому полипептиду, кодируемому таким гибридирующимся полинуклеотидом. В одном варианте осуществления изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей в основном из SEQ ID NO: 84 или SEQ ID NO: 85.

Как правило, полинуклеотиды гибридируются в условиях низкой, умеренной или высокой строгости и кодируют антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, сохраняющие способность связывания с TIGIT (человека, макака-резуса и/или яванского макака, например, *Macaca fascicularis*). Молекула первого полинуклеотида является "способной к гибридизации" с молекулой второго полинуклеотида, когда одноцепочечная форма молекулы первого полинуклеотида может гибридизоваться с молекулой второго полинуклеотида в условиях подходящих температуры и ионной силы раствора (см. Sambrook et al., выше). Условия температуры и ионной силы определяют "строгость" гибридизации. Типичные условия низкой строгости гибридизации включают 55°C, 5X SSC, 0,1% SDS и отсутствие формамида; или 30% формамид, 5X SSC, 0,5% SDS при 42°C. Типичные условия умеренной строгости гибридизация представляют собой 40% формамид, с 5X или 6X SSC и 0,1% SDS при 42°C. Условия высокой строгости гибридизации представляют собой 50% формамид, 5X или 6X SSC при 42°C или, необязательно, при более высокой температуре (например, 57, 59, 60, 62, 63, 65 или 68°C). Как правило, SSC представляет собой 0,15M NaCl и 0,015M Na-цитрат. Гибридизация требует того, чтобы два полинуклеотида содержали комплементарные последовательности, хотя в зависимости от строгости гибридизации возможны несоответствия между основаниями. Подходящая строгость для гибридизации полинуклеотидов зависит от длины полинуклеотидов и степени комплементарности, переменных, хорошо известных в данной области. Чем больше степень сходства или гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, тем выше строгость, при которой нуклеиновые кислоты могут гибридизоваться. Для гибридов длиной более 100 нуклеотидов, разработаны уравнения для расчета температуры плавления (см. Sambrook, et al., выше, 9,50-9,51). Для гибридизации с более короткими полинуклеотидами, например, олигонуклеотидами, положения несоответствий становятся более важными, и длина олигонуклеотида определяет его специфичность (см. Sambrook, et al., выше, 11.7-11.8).

В другом варианте осуществления представлен выделенный полинуклеотид, например ДНК, кодирующая полипептидные цепи выделенных антител или антигенсвязывающих фрагментов, указанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления выделенный полинуклеотид кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по меньшей мере один вариабельный домен (V_L) легкой цепи зрелого иммуноглобулина по изобретению и/или по меньшей мере один вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи зрелого иммуноглобулина по изобретению. В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует как легкую цепь, так и тяжелую цепь на одной полинуклеотидной молекуле, и в других вариантах осуществления легкие и тяжелые цепи кодированы на отдельных полинуклеотидных молекулах. В другом варианте осуществления полинуклеотид дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR-H1 (SEQ ID NO: 1), CDR-H2 (SEQ ID NO: 2) и CDR-H3 (SEQ ID NO: 3 или 79 или 80 или 81 или 82, 83 или 140).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR-L1 (SEQ ID NO: 4), CDR-L2 (SEQ ID NO: 5 или 65, или 66, или 67, или 68, или 69, или 70, или 71, или 72, или 73, или 141) и CDR-L3 (SEQ ID NO: 6 или 74, или 75, или 76, или 77, или 78).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, коди-

рующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина из любой из SEQ ID NO: 9-24 или 37-47.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из любой из SEQ ID NO: 25-30 или 48-52.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR-H1 (SEQ ID NO: 57), CDR-H2 (SEQ ID NO: 58) и CDR-H3 (SEQ ID NO: 59).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR-L1 (SEQ ID NO: 60), CDR-L2 (SEQ ID NO: 61) и CDR-L3 (SEQ ID NO: 62).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 64.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR-H1 (SEQ ID NO: 88), CDR-H2 (SEQ ID NO: 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134 или 135) и CDR-H3 (SEQ ID NO: 90).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен легкой цепи (V_L) антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR-L1 (SEQ ID NO: 91), CDR-L2 (SEQ ID NO: 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 или 123) и CDR-L3 (SEQ ID NO: 93).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 94.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 95.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина из любой из SEQ ID NO: 124-129.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из любой из SEQ ID NO: 130-133.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 127.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 128.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 130.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 132.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина из SEQ ID NO: 133.

Настоящее изобретение относится также к векторам, например экспрессирующим векторам, таким как плазмиды, содержащим выделенные полинуклеотиды по изобретению, где полинуклеотид является функционально связанным с контрольными последовательностями, узнаваемыми клеткой-хозяином, когда клетку-хозяина трансфицируют вектором. Представлены также клетки-хозяева, содержащие вектор по настоящему изобретению, и способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, описанного в настоящем документе, включающие культивирование клетки-хозяина, несущей экспрессирующий вектор или нуклеиновую кислоту, кодирующие иммуноглобулиновые цепи антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в среде для культивирования, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина или среды для культивирования.

Настоящее изобретение относится также к полипептидам, например полипептидам иммуноглобулинов, содержащим аминокислотные последовательности, являющиеся по меньшей мере приблизительно на 75% идентичными, на 80% идентичными, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичными и наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичными (например, на 95, 96, 97, 98, 99, 100%) аминокислотным последовательностям антител, представленных в настоящем документе, когда сравнение проводят посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями на протяжении полной длины соответствующих эталонных последовательностей (например, ожидаемый порог: 10; размер слова: 3; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; матрица BLOSUM 62; стоимость пропуска: существование 11, продление 1; условная структурная коррекция матрицы баллов).

Идентичность последовательности относится к степени, в которой аминокислоты из двух полипеп-

тидов являются одинаковыми в эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены.

Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, часто используемым для анализа последовательностей: BLAST ALGORITHMS: Altschul et al. (2005) FEBS J., 272(20): 5101-5109; Altschul S.F. et al., (1990) J. Mol. Biol., 215:403-410; Gish W. et al., (1993) Nature Genet., 3:266-272; Madden T.L. et al., (1996) Meth. Enzymol., 266:131-141; Altschul S.F., et al., (1997) Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; Zhang J. et al., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton J.C. et al., (1993) Comput. Chem., 17:149-163; Hancock J.M. et al., (1994) Comput. Appl. Biosci., 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff M.O. et al., "A model of evolutionary change in proteins", in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C.; Schwartz R.M. et al., "Matrices for detecting distant relationships", in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C.; Altschul S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J. et al., (1991) Methods 3:66-70; Henikoff S. et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919; Altschul S.F. et al., (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin S., et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin S. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo A. et al., (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; and Altschul S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments", in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

Аффинность связывания.

В качестве примера, и без ограничения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут связывать TIGIT человека с значением K_D по меньшей мере приблизительно 1×10^{-9} М (т.е. с значением K_D 1×10^{-9} М или ниже), как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET). В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут связывать TIGIT человека с значением K_D по меньшей мере от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET). В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут связывать TIGIT человека с значением K_D от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, как определено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или сходного способа (например, KinExa или OCTET). В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут связывать TIGIT человека с значением K_D по меньшей мере приблизительно 50 пМ (т.е. с значением K_D приблизительно 50 пМ или ниже), как определено посредством BIACORE или сходного способа. В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут связывать TIGIT человека с значением K_D по меньшей мере приблизительно 10 пМ (т.е. с значением K_D приблизительно 10 пМ или ниже), как определено посредством BIACORE или сходного способа. В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут связывать TIGIT человека с K_D от приблизительно от 50 пМ до приблизительно 1 пМ, как определено посредством BIACORE или сходного способа.

Активация иммунцитов.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению увеличивают активность иммунцитов. Увеличение активности иммунцитов можно детектировать с использованием любого способа, известного в данной области. В одном варианте осуществления увеличение активности иммунцитов можно детектировать посредством измерения пролиферации иммунцитов. Например, увеличение активности Т-клеток можно детектировать посредством измерения пролиферации Т-клеток или событий передачи сигнала, таких как тирозинное фосфорилирование иммунных рецепторов или нижестоящих киназ, которые переносят сигналы к регуляторам транскрипции. В других вариантах осуществления увеличение активности иммунцитов можно детектировать посредством измерения цитотоксической функции клеток CTL или NK на специфических клетках-мишенях или ответов цитокина $IFN\gamma$, которые ассоциированы со стимуляцией противоопухолевого иммунитета. В других вариантах осуществления увеличение активности иммунцитов можно детектировать посредством измерения активации Т-клеток *ex vivo* в образце, полученном от субъекта. В одном варианте осуществления увеличение активности Т-клеток определяют посредством: (i) измерения индуцированной SEB (энтеротоксином В *Staphylococcus*) продукции одного или несколько провоспалительных цитокинов, выбранных из группы, состоящей из: IL-2, $TNF\alpha$, IL-17, $IFN\gamma$, IL-1 β , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 и IL-13; или (ii) измерения реакций смешанной культуры лимфоцитов или прямой стимуляции посредством mAb против CD3 передачи сигнала Т-клеточного рецептора (TCR) для индукции продукции цитокина, выбранного из группы, состоящей из IL-2, $TNF\alpha$, IL-17, $IFN\gamma$, IL-1 β , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 и IL-13. В конкретных вариантах осуществления антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может стимулировать продукцию IL-2 и/или $IFN\gamma$ антигенспеци-

фическими Т-клетками по меньшей мере в 1,5 раза.

Настоящее изобретение относится к антителам-антагонистам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам и к способам их применения, например к гуманизированным антителам-антагонистам и фрагментам против TIGIT. Антитело-антагонист против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент проявляют антагонизм к активности TIGIT человека, например, посредством ингибирования связывания TIGIT с CD155 и CD112, и ингибирования передачи сигнала функционального ИТМ посредством TIGIT при связывании с CD155 и CD112. Измерение антагонистической активности против TIGIT можно оценивать посредством демонстрации блокирования супрессии Т-клеток после активации TCR, индуцированной лигированием TIGIT с родственными лигандами CD155 и CD112. Таким образом, в одном варианте осуществления увеличенных ответов обработка антителами-антагонистами против TIGIT является способной восстанавливать ответы IL-2 до уровней, наблюдаемых в Т-клетках, не репрессированных путем индукции TIGIT посредством CD155 или CD112. При более предпочтительном уровне активации ответы после обработки с помощью антитела-антагониста против TIGIT могут представлять собой ответы, увеличенные до уровня, более высокого, чем ответы Т-клеток, не репрессированных посредством CD155 или CD112.

Способность антител против hTIGIT блокировать связывание с hCD155 и hCD112.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты против TIGIT по изобретению являются способными блокировать связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека. Способность блокировать связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека можно определять с использованием любого способа, известного в данной области. В одном варианте осуществления способность антител блокировать связывание TIGIT человека с CD155 человека и CD112 человека определяют с использованием анализа ELISA, как описано в примере 2.

Способы получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

Клетки гибридомы, продуцирующие исходные (например, крысиные или мышьиные) моноклональные антитела против TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты, обсуждаемые в настоящем документе, можно получать способами, общеизвестными в данной области. Такие выделенные гибридомы являются частью настоящего изобретения. Эти способы включают, но без ограничения, способ гибридомы, первоначально разработанный Kohler et al., (1975) (*Nature* 256:495-497), а также способ триомы (Hering et al., (1988) *Biomed. Biochim. Acta.* 47:211-216 и Hagiwara et al., (1993) *Hum. Antibod. Hybridomas* 4:15), способ гибридомы В-клеток человека (Kozbor et al., (1983) *Immunology Today* 4:72 и Cote et al., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A* 80:2026-2030), способ EBV-гибридомы (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985) и электрослияния, обусловленного электрическим полем, с использованием электропоратора для слияния клеток с большой камерой Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Предпочтительно, спленоциты мыши выделяют и сливают с помощью PEG или посредством электрослияния с линией клеток миеломы мыши на основе стандартных способов. Затем можно проводить скрининг полученных гибридом по продукции антигенспецифических антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки от иммунизированных мышей можно сливать с одной шестой количества несекретирующих клеток миеломы мыши P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) с помощью 50% ПЭГ. Клетки можно посеять при приблизительно 2×10^5 клеток/мл в плоскодонный микропланшет для титрования, с последующими двумя неделями инкубации в селективной среде, содержащей 20% эмбриональную сыворотку fetal Clone, 18% кондиционированную среду "653", 5% origen (IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанол, 50 ед./мл пенициллин, 50 мг/мл стрептомицин, 50 мг/мл гентамицин и 1X НАТ (Sigma; НАТ добавляют через 24 ч после слияния). Через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой НАТ заменен на НТ. Затем можно проводить скрининг индивидуальных лунок посредством ELISA по моноклональным антителам IgG против TIGIT. После начала интенсивного роста гибридомы можно проводить наблюдение за средой, как правило, через 10-14 суток. Гибридомы, секретирующие антитело, можно пересевать, снова подвергать скринингу, и, если они все еще положительны по IgG человека, моноклональные антитела против TIGIT, можно субклонировать по меньшей мере дважды посредством лимитирующего разведения. Стабильные субклоны можно затем культивировать *in vitro* для получения небольших количеств антитела в культуральной среде для характеристики.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам получения антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, включающим культивирование клеток гибридомы, экспрессирующей антитело или фрагмент, в условиях, благоприятных для такой экспрессии, и, необязательно, выделение антитела или фрагмента из гибридомы и/или среды для выращивания (например, среды для культивирования клеток).

Антитела против TIGIT, описанные в настоящем документе, также можно получать рекомбинантным образом (например, в экспрессирующей системе *E.coli*/T7, в экспрессирующей системе клеток млекопитающего или в экспрессирующей системе низших эукариот). В этом варианте осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуноглобулиновые молекулы антител по изобретению (например, V_H или V_L), можно вставлять в плазмиду на основе pET и экспрессировать в системе *E.coli*/T7. Например, настоящее изобретение относится к способам экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фраг-

мента или его иммуноглобулиновой цепи в клетке-хозяине (например, бактериальной клетке-хозяине, такой как *E.coli*, такой как BL21 или BL21DE3), включающим экспрессию РНК-полимеразы T7 в клетке, которая также содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновую цепь, функционально связанный с промотором T7. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения бактериальная клетка-хозяин, такая как *E.coli*, содержит полинуклеотид, кодирующий ген РНК-полимеразы T7, функционально связанный с промотором *lac*, и экспрессию полимеразы и цепи индуцируют посредством инкубации клетки-хозяина с IPTG (изопропил-бета-D-тиогактопиранозидом).

Существует несколько способов получения рекомбинантных антител, известных в данной области. Один пример способа рекомбинантного получения антител описан в патенте США № 4816567.

Трансформацию можно проводить любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида (полинуклеотидов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетки млекопитающих посредством вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США № 4399216; 4912040; 4740461 и 4959455.

Таким образом, настоящее изобретение относится к рекомбинантным способам получения антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, или его иммуноглобулиновой цепи, включающим введение полинуклеотида, кодирующего одну или несколько иммуноглобулиновых цепей антитела или фрагмента (например, тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина); культивирование клетки-хозяина (например, CHO или *Pichia*, или *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для такой экспрессии, и, необязательно, выделение антитела или фрагмента, или цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой выращивают клетку-хозяина.

Антитела против TIGIT можно также синтезировать любым из способов, указанных в патенте США № 6331415.

Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, включая клетки млекопитающих, в качестве хозяев для экспрессии антител или фрагментов, или иммуноглобулиновых цепей, описанных в настоящем документе, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных линий клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночно-клеточной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK-293 и ряд других линий клеток. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные линии клеток выбирают посредством определения того, какие линии клеток обладают высокими уровнями экспрессии. Другими линиями клеток, которые можно использовать, являются линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9, клетки амфибий, бактериальные клетки, клетки растений и клетки грибов. Клетки грибов включают клетки дрожжей и мицелиальных грибов, включая, например, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanoica*, виды *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, виды *Saccharomyces*, *Hansenula polymorpha*, виды *Kluyveromyces*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*, виды *Pichia*, любые виды *Saccharomyces*, *Hansenula polymorpha*, любые виды *Kluyveromyces*, *Candida albicans*, любые виды *Aspergillus*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, любые виды *Fusarium*, *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или фрагмент, легкую цепь и/или ее антигенсвязывающий фрагмент, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают посредством культивирования клетки-хозяева в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить экспрессию антитела или фрагмента, или цепи в клетках-хозяевах, или секрецию в среду для культивирования, в которой выращивают клетки-хозяева.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты и цепи иммуноглобулинов можно выделять из среды для культивирования с использованием стандартных способов очистки белка. Кроме того, экспрессию антител и их антигенсвязывающих фрагментов и цепей иммуноглобулинов по изобретению (или других молекул из них) из линии клеток-производителей можно улучшать с использованием ряда известных способов. Например, экспрессия генов системы глутаминсинтетазы (системы GS) является общераспространенным способом улучшения экспрессии в определенных условиях. Систему GS обсуждают полностью или частично в связи с Европейскими патентами № 0216846, 0256055 и 0323997 и Европейской патентной заявкой № 89303964.4. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения клетки-хозяева млекопитающих (например, CHO) лишены гена глутаминсинтетазы, и их выращивают в отсутствие глутаминина в среде, где, однако, полинуклеотид, кодирующий цепь иммуноглобулина, содержит ген глутаминсинтетазы, комплементирующий отсутствие гена в клетке-хозяине.

Настоящее изобретение относится к способам очистки антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, включающим введение образца, содержащего антитело или фрагмент, в среду для очистки (например, катионообменную среду, анионообменную среду, среду для гидрофобного обмена, среду для аффинной очистки (например, белок-A, белок-G, белок-A/G, белок-L)) и либо сбор очищенного антитела или фрагмента из фракции фильтрата из указанного образца, которая не связывается с средой; либо отбрасывание фракции фильтрата и элюции связанного антитела или фрагмента из среды и сбора элюата. В одном из вариантов осуществления изобретения среда находится в колонке, на которую наносят образец. В одном из вариантов осуществления изобретения способ очистки проводят после рекомбинантной экспрессии антитела или фрагмента в клетке-хозяине, например, где клетку-хозяина сначала лизируют и, необязательно, лизат очищают от нерастворимых материалов перед очисткой на среде.

Как правило, гликопротеины, продуцируемые в конкретной линии клеток или трансгенном животном, обладают паттерном гликозилирования, характерным для гликопротеинов, продуцируемых в линии клеток или трансгенном животном. Таким образом, конкретный паттерн гликозилирования антитела зависит от конкретной линии клеток или трансгенного животного, используемых для продукции антитела. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, представленными в настоящем документе, или содержащие аминокислотные последовательности, представленные в настоящем документе, включены в настоящее изобретение, независимо от паттерна гликозилирования, который могут иметь антитела. Подобным образом, в конкретных вариантах осуществления антитела с паттерном гликозилирования, содержащим только нефукозилированные IV-гликаны, могут предоставлять преимущества, поскольку показано, что эти антитела как правило, обладают более сильной эффективностью, чем их фукозилированные эквиваленты, как *in vitro*, так и *in vivo* [см., например, Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 3466-3473 (2003); патенты США № 6946292 и 7214775]. Эти антитела с нефукозилированными N-гликанами маловероятно являются иммуногенными, поскольку их углеводные структуры являются нормальным компонентом популяции, существующей в IgG сыворотки человека.

Настоящее изобретение относится к поликлональным антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам, например к композиции, содержащей множество антител против TIGIT и фрагментов, включающих одно или несколько антител против TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, и к способам их применения. Поликлональное антитело представляет собой антитело, полученное вместе с одним или несколькими другими, не идентичными, антителами или в их присутствии. Как правило, поликлональные антитела получают из наборов различных В-лимфоцитов, например В-лимфоцитов от животного, обработанного представляющим интерес иммуногеном, которые продуцируют популяцию различных антител, но которые все направлены против иммуногена. Как правило, поликлональные антитела получают непосредственно от иммунизированного животного, например из селезенки, сыворотки или асцитной жидкости.

Изобретение относится к биспецифическим и бифункциональным антителам и антигенсвязывающим фрагментам, обладающим специфичностью связывания для TIGIT и другого антигена, например, такого как PD-1, или PD-L1, или LAG-3, и к способам их применения. В одном из вариантов осуществления изобретения цепи против TIGIT содержат любую из последовательностей VH/VL, описанных в табл. 4, и цепи против PD1 содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 33 и 34, или из SEQ ID NO: 35 и 36 (или антигенсвязывающий фрагмент из любой из указанных последовательностей). Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, обладающее двумя различными парами тяжелых/легких цепей и двумя различными участками связывания. Биспецифические антитела можно получать множеством способов, включая слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai et al., (1990) *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321, Kostelny et al., (1992) *J. Immunol.*, 148:1547-1553. Кроме того, биспецифические антитела могут быть сформированы как "диатела" (Holliger et al., (1993) *PNAS USA*, 90:6444-6448) или как "янусины" (Traunecker et al., (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659 и Traunecker et al., (1992) *Int. J. Cancer Suppl.* 7:51-52).

Настоящее изобретение, кроме того, относится к направленным против TIGIT антигенсвязывающим фрагментам антител против TIGIT, описанным в настоящем документе. Фрагменты антител включают фрагменты F(ab)₂, которые можно получать посредством ферментативного расщепления IgG, например посредством пепсина. Фрагменты Fab можно получать, например, посредством восстановления F(ab)₂ с помощью дитиотреитола или меркаптоэтиламина.

Иммуноглобулины можно относить к различным классам в зависимости от аминокислотных последовательностей константного домена их тяжелых цепей. Существует по меньшей мере пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и несколько из них можно далее подразделять на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; IgA1 и IgA2. Изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител из любого из этих классов или подклассов.

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи, например человеческую константную область, такую как константная область тяжелой цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ или $\gamma 4$ человека, или ее вариант. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область легкой цепи, например челове-

скую константную область легкой цепи, такую как область легкой цепи лямбда или каппа человека, или ее вариант. В качестве неограничивающего примера, константная область тяжелой цепи человека может представлять собой $\gamma 4$, и константная область легкой цепи человека может представлять собой каппа. В альтернативном варианте осуществления Fc-область антитела представляет собой $\gamma 4$ с мутацией Ser228Pro (Schuurman J. et al., Mol. Immunol., 38: 1-8, 2001).

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи подтипа IgG1.

В некоторых вариантах осуществления различные константные домены можно присоединять к гуманизированным областям V_L и V_H , полученным из CDR, представленных в настоящем документе. Например, если конкретное намеченное применение антитела (или фрагмента) по настоящему изобретению требует измененных эффекторных функций, можно использовать константный домен тяжелой цепи, отличный от IgG1 человека, или можно использовать гибрид IgG1/IgG4.

Хотя антитела IgG1 человека обеспечивают длительное время полужизни и эффекторные функции, такие как активация комплемента и антителозависимая клеточная цитотоксичность, такие виды активности могут не являться желательными для всех применений антитела. В таких случаях можно использовать, например, константный домен IgG4 человека. Настоящее изобретение относится к антителам против TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим константный домен IgG4, например антагонистическим, гуманизированным антителам против TIGIT и фрагментам и к способам их применения. В одном варианте осуществления константный домен IgG4 может отличаться от природного константного домена IgG4 человека (номер доступа в Swiss-Prot Accession № P01861.1) в положении, соответствующем положению 228 в системе EU и положению 241 в системе КАВАТ, где природный Ser108 заменен на Pro для предотвращения потенциальной межцепевой дисульфидной связи между Cys106 и Cys109 (соответствующими положениям Cys 226 и Cys 229 в системе EU и положениям Cys 239 и Cys 242 в системе КАВАТ), которая может мешать формированию правильной внутрицепевой дисульфидной связи. См. Angal et al. (1993) Mol. Immunol., 30:105. В других случаях можно использовать модифицированный константный домен IgG1, модифицированный для увеличения времени полужизни или ослабления эффекторной функции.

Конструирование антител.

Далее включены варианты осуществления, в которых антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой антитела, сконструированные для включения модификаций в каркасные остатки внутри вариабельных доменов исходного (например, мышиноного или крысиного) моноклонального антитела, например для улучшения свойств антитела или фрагмента. Как правило, такие модификации каркаса выполняют для уменьшения иммуногенности антитела или фрагмента. Это, как правило, осуществляют посредством замены не относящихся к CDR остатков в вариабельных доменах (т.е. каркасных остатков) в исходном (например, относящемся к грызунам) антителе или фрагменте на аналогичные остатки из иммунного репертуара видов, использованию в которых подлежит антитело, например человеческие остатки в случае терапевтического средства для человека. Такое антитело или фрагмент обозначают как "гуманизированное" антитело или фрагмент. В некоторых случаях желательно увеличить аффинность или изменить специфичность сконструированного (например, гуманизированного) антитела. Одним из способов является "обратный мутагенез" одного или нескольких каркасных остатков до соответствующей зародышевой последовательности. Более конкретно, антитело или фрагмент, подвергавшиеся соматической мутации, могут содержать каркасные остатки, отличающиеся от зародышевой последовательности, из которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать посредством сравнения каркасных последовательностей антитела или фрагмента с зародышевыми последовательностями, из которых происходит антитело или фрагмент. Другим способом является возвращение к исходному родительскому (например, относящемуся к грызунам) остатку в одном или нескольких положениях сконструированного (например, гуманизированного) антитела, например, для восстановления аффинности связывания, которая может быть потеряна в процессе замены каркасных остатков. (См., например, патент США № 5693762, патент США № 5585089 и патент США № 5530101.)

В конкретных вариантах осуществления антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты являются сконструированными (например, гуманизированными), чтобы включать модификации в каркасе и/или CDR для улучшения их свойств. Такие сконструированные изменения могут быть основаны на молекулярном моделировании. Молекулярную модель для вариабельной области для исходной (не относящейся к человеку) последовательности антитела можно конструировать для понимания структурных признаков антитела и использовать для идентификации потенциальных областей на антителе, которые могут взаимодействовать с антигеном. Общепринятые CDR основаны на выравнивании последовательностей иммуноглобулинов и идентификации вариабельных областей. Rabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Rabat et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. № 91-3242; Rabat (1978) Adv. Prot. Chem., 32:1-75; Rabat et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616. Chothia и соавторы тщательно исследовали конформации петель в кристаллических структурах антител и предложили гипервариабельные петли. Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917 или Chothia et al.,

(1989) *Nature* 342:878-883. Существуют различия между областями, классифицированными как "CDR" и "гипервариабельные петли". В более поздних исследованиях (Raghunathan et al., (2012) *J. Mol. Recog.*, 25, 3, 103-113) анализировали несколько кристаллических комплексов антитело-антиген и наблюдали, что антигенсвязывающие области в антителах не обязательно принимают строгую конформацию по остаткам "CDR" или "гипервариабельным" петлям. Молекулярную модель для вариабельной области не относящегося к человеку антитела можно использовать в качестве руководства для выбора областей, которые потенциально могут связываться с антигеном. На практике потенциальные антигенсвязывающие области, основанные на модели, отличаются от общепринятых "CDR" или "гипервариабельных" петель. Коммерческое научное программное обеспечение, такое как MOE (Chemical Computing Group), можно использовать для молекулярного моделирования. Человеческие каркасные области можно выбирать на основании наилучших совпадений с не относящейся к человеку последовательностью как в каркасных областях, так и в CDR. Для FR4 (каркасной области 4) в VH, области VJ из зародышевых последовательностей человека сравнивают с соответствующей не относящейся к человеку областью. В случае FR4 (каркасной области 4) в VL, области J-каппа и J-лямбда из зародышевых последовательностей человека сравнивают с соответствующей не относящейся к человеку областью. После идентификации подходящих человеческих каркасных областей CDR прививают в выбранные человеческие каркасные области. В некоторых случаях конкретные остатки на поверхности раздела VL-VH можно оставлять, как в не относящейся к человеку (исходной) последовательности.

Молекулярные модели можно также использовать для идентификации остатков, которые могут потенциально изменять конформации CDR, и таким образом, связывание с антигеном. В некоторых случаях эти остатки сохраняют, как в не относящейся к человеку (исходной) последовательности. Молекулярные модели можно также использовать для идентификации экспонированных для растворителя аминокислот, которые могут приводить к нежелательным эффектам, таким как гликозилирование, дезамидирование и окисление. Выявляющие фильтры можно использовать рано на стадии разработки для исключения/минимизации этих потенциальных проблем.

Другой тип модификации каркаса включает мутагенез одного или нескольких остатков в каркасной области, или даже в одной или нескольких областях CDR, для удаления эпитопов для Т-клеток, чтобы таким образом уменьшить потенциальную иммуногенность антитела. Этот способ обозначают также как "деиммунизацию", и он более подробно описан в патенте США № 7125689.

В конкретных вариантах осуществления желательно заменять конкретные аминокислоты, содержащие экспонированные боковые цепи, на другой аминокислотный остаток, чтобы обеспечивать большую химическую стабильность конечного антитела, так чтобы исключить дезамидирование или изомеризацию. Дезамидирование аспарагина может происходить в последовательностях NG, DG, NG, NS, NA, NT, QG или QS и приводит к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который вводит перегиб в полипептидную цепь и уменьшает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты). Изомеризация может происходить в последовательностях DG, DS, DA или DT. В конкретных вариантах осуществления антитела по описанию не содержат участков дезамидирования или изомеризации аспарагина.

Например, остаток аспарагина (Asn) можно заменять на Gln или Ala для уменьшения потенциала образования изоаспартата в любой из последовательностей Asn-Gly, в частности, внутри CDR. Сходная проблема может возникать в последовательности Asp-Gly. Reissner and Aswad (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1281. Формирование изоаспартата может ослаблять или полностью прекращать связывание антитела с его антигеном-мишенью. См., Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734. В одном варианте осуществления аспарагин заменяют на глутамин (Gln). Также может быть желательным изменять аминокислоту, смежную с остатком аспарагина (Asn) или глутамина (Gln), для уменьшения вероятности дезамидирования, которое происходит с большей частотой, когда небольшие аминокислоты оказываются смежными с аспарагином или глутамином. См., Bischoff & Kolbe (1994) *J. Chromatog.* 662:261. Кроме того, любые остатки метионина (как правило, экспонированного для растворителя Met) в CDR можно заменять на Lys, Leu, Ala или Phe, или другие аминокислоты, для уменьшения вероятности того, что сера метионина будет окисляться, что может уменьшать аффинность связывания с антигеном, а также вносить вклад в молекулярную гетерогенность в конечном препарате антитела, там же. Кроме того, для предотвращения или минимизации потенциального расщепления пептидных связей Asn-Pro может являться желательным заменять любые комбинации Asn-Pro, обнаруженные в CDR, на Gin-Pro, Ala-Pro или Asn-Ala. Затем проводят скрининг антител с такими заменами, чтобы удостовериться, что замены не уменьшают аффинность или специфичность антитела в отношении TIGIT, или другую желательную биологическую активность до неприемлемых уровней.

Таблица 2. Иллюстративные стабилизирующие CDR варианты

Остаток CDR	Стабилизирующий вариант последовательности
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly, или Asn-Ala (Q-G), (A-G), или (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly или Asp-Ala (E-G), (A-G), или (D-A)
Met (как правило, экспонированный для растворителя) (M)	Lys, Leu, Ala, или Phe (K), (L), (A), или (F)
Asn (N)	Gln или Ala (Q) или (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro, или Asn-Ala (Q-P), (A-P), или (N-A)

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CDR3 из SEQ ID NO: 3 можно модифицировать в положении 110W для уменьшения или исключения потенциального окисления (где нумерация приведена в соответствии с Rabat). Таким образом, например, SEQ ID NO: 3 (MPSFIT-LASLSTWEGYFDF) можно модифицировать до любой из следующих последовательностей: MPSFIT-LASLSTFEGYFDF (SEQ ID NO: 79), MPSFITLASLSTYEGYFDF (SEQ ID NO: 80), MPSFITLASLSTIEGYFDF (SEQ ID NO: 81), MPSFITLASLSTVEGYFDF (SEQ ID NO: 82) или MPSFITLASLSTLEGYFDF (SEQ ID NO: 83). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 из SEQ ID NO: 1, CDR2 из SEQ ID NO: 2 и CDR3 из SEQ ID NO: 3, 79, 80, 81, 82 или 83.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CDR2 из SEQ ID NO: 5 можно модифицировать в положениях 52N и 53S для уменьшения или исключения потенциальных участков дезамидирования (где нумерация приведена в соответствии с Rabat). Таким образом, например, SEQ ID NO: 5 (YANSLQT) можно модифицировать до любой из следующих последовательностей: YANSLQT (SEQ ID NO: 65), YASSLQT (SEQ ID NO: 66), YASTLQT (SEQ ID NO: 67), YATTLQT (SEQ ID NO: 68), YASYLQT (SEQ ID NO: 69), YANQLQT (SEQ ID NO: 70), YAGSLQT (SEQ ID NO: 71), YASQLQT (SEQ ID NO: 72), YADSLQT (SEQ ID NO: 73). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT по изобретению содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 из SEQ ID NO: 4, CDR2 из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73 и CDR3 из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CDR3 из SEQ ID NO: 6 можно модифицировать в положении 95W для уменьшения или исключения потенциального окисления (где нумерация приведена в соответствии с Rabat). Таким образом, например, SEQ ID NO: 6 (QQYYSGWT) можно модифицировать до любой из следующих последовательностей: QQYYSGFT (SEQ ID NO: 74), QQYYSGYT (SEQ ID NO: 75), QQYYSGIT (SEQ ID NO: 76), QQYYSGVT (SEQ ID NO: 77), QQYYSGLT (SEQ ID NO: 78). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT по изобретению содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 из SEQ ID NO: 4, CDR2 из SEQ ID NO: 5 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT по изобретению содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 из SEQ ID NO: 4, CDR2 из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 78.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT по изобретению содержит область FR4 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 7, 9-24 или 38-47, где M в положении 122 заменен на V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W или L для исключения потенциального окисления.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT по изобретению содержит область FR4 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 7, 9-24 или 38-47, где M в положении 122 и V в положении 123 заменены на T и L, соответственно, для исключения потенциального окисления.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CDR3 из SEQ ID NO: 90 можно модифицировать в положении 6 для уменьшения или исключения потенциального окисления. Таким образом, например, SEQ ID NO: 90 (GGPYGWYFDV) можно модифицировать до любой из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 154-167.

Конструирование Fc-области антитела.

Антитела (например, гуманизированные антитела) и их антигенсвязывающих фрагменты, описан-

ные в настоящем документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты), также можно конструировать для включения модификаций в Fc-область, как правило, для изменения одного или нескольких свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с рецептором Fc, и/или эффекторная функция (например, антигензависимая клеточная цитотоксичность). Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты), можно химически модифицировать (например, одну или несколько химических групп можно присоединять к антителу) или модифицировать для изменения его гликозилирования, также для изменения одного или нескольких свойств антитела или фрагмента. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области представляет собой индекс EU по Rabat.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты), включают также антитела и фрагменты с модифицированными (или блокированными) Fc-областями для обеспечения измененных эффекторных функций. См., например, патент США № 5624821; WO 2003/086310; WO 2005/120571; WO 2006/0057702. Такие модификации можно использовать для усиления или супрессии различных реакций иммунной системы, с возможными благоприятными эффектами для диагностики и терапии. Изменения в Fc-области включают изменения аминокислот (замены, делеции и вставки), гликозилирование или дегликозилирование и добавление множественных Fc-областей. Изменения в Fc могут также изменять время полужизни антител в терапевтических антителах, позволяя менее частое дозирование и таким образом, увеличенное удобство и уменьшенное использование материала. См. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734-35.

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14А6, 28Н5, 31С6 или их гуманизированные варианты) представляют собой антитело или фрагмент изотипа IgG4, содержащие мутацию серина до пролина в положении, соответствующем положению 228 (S228P; индекс EU) в шарнирной области константной области тяжелой цепи. Опубликовано, что эта мутация исключает гетерогенность дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями в шарнирной области (Angal et al. выше; положение 241 на основании системы нумерации Rabat).

В одном варианте осуществления изобретения шарнирную область СН1 модифицируют так, что количество остатков цистеина в шарнирной области увеличивается или уменьшается. Этот способ дополнительно описан в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления шарнирную область Fc антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению (например, 14А6, 28Н5 или 31С6 или их гуманизированных вариантов) подвергают мутагенезу для уменьшения биологического времени полужизни антитела или фрагмента. Более конкретно, одну или несколько аминокислотных мутаций вводят в поверхность контакта СН2-СН3 домена Fc-шарнирного фрагмента, так что антитело или фрагмент обладают нарушенным связыванием стафилококкового белка А (SpA) относительно связывания SpA природным Fc-шарнирным доменом. Этот способ более подробно описан в патенте США № 6165745.

В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14А6 или 28Н5 или его гуманизированный вариант) модифицируют для увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные способы. Например, можно вводить одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375. Альтернативно, для увеличения биологического времени полужизни, антитело можно изменять внутри области СН1 или СL, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора спасения, взятый из двух петель домена СН2 Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022.

В других вариантах осуществления Fc-область изменяют посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторной функции(функций) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменять на другой аминокислотный остаток, так чтобы антитело обладало измененной аффинностью для эффекторного лиганда и сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность для которого изменяют, может представлять собой, например, рецептор Fc или компонент комплемента С1. Этот способ более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260.

В другом примере, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменять на другой аминокислотный остаток, так чтобы антитело обладало измененным связыванием С1q и/или уменьшенной или утраченной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Этот способ более подробно описан в патенте США № 6194551.

В другом примере, один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231 и 239, изменяют, чтобы таким образом изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот способ дополнительно описан в публикации РСТ WO 94/29351.

В другом примере Fc-область модифицируют для уменьшения способности антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению (например, 14А6 или 28Н5, или их гуманизированного вари-

анта) опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для уменьшения аффинности антитела или фрагмента для рецептора Fcγ посредством модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Этот способ дополнительно описан в публикации PCT WO 00/42072. Более того, картированы участки связывания на IgG1 человека для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn, и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

В одном варианте осуществления изобретения Fc-область модифицируют для уменьшения способности антитела по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированных вариантов) опосредовать эффекторную функцию и/или увеличивать противовоспалительные свойства посредством модификации остатков 243 и 264. В одном варианте осуществления Fc-область антитела или фрагмента модифицируют посредством изменения остатков в положениях 243 и 264 на аланин. В одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для уменьшения способности антитела или фрагмента опосредовать эффекторную функцию и/или для увеличения противовоспалительных свойств посредством модификации остатков 243, 264, 267 и 328.

Усиление эффекторной функции.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела против TIGIT модифицируют для увеличения способности антитела или антигенсвязывающего фрагмента опосредовать эффекторную функцию и/или для усиления их связывания с рецепторами Fc-гамма (FcγRs).

Термин "эффекторная функция", как применяют в настоящем документе, предназначен для обозначения одного или нескольких из антителозависимой опосредованной клетками цитотоксической активности (ADCC), ответов, опосредованных комплементзависимой цитотоксической активностью (CDC), опосредованного Fc фагоцитоза или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и рециркуляции антитела посредством рецептора FcRn.

Считают, что взаимодействие между константной областью антигенсвязывающего белка и различными рецепторами Fc (FcR), включая FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), опосредует эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, антигенсвязывающего белка. Рецептор Fc также является важным для перекрестного связывания антител, которое может являться важным для противоопухолевого иммунитета.

Эффекторную функцию можно измерять рядом способов, включая, например, измерение посредством связывания FcγRIII с клетками естественными киллерами или посредством связывания FcγRI с моноцитами/макрофагами для измерения эффекторной функции ADCC. Например, антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению можно оценивать по эффекторной функции ADCC в анализе клеток естественных киллеров. Примеры таких анализов можно найти в Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., Vol. 276, p. 6591-6604; Chappel et al., 1993, J. Biol. Chem., Vol. 268, p. 25124-25131; Lazar et al., 2006, PNAS, 103; 4005-4010.

Свойства ADCC или CDC антител по настоящему изобретению или их свойства перекрестного связывания, можно усиливать рядом способов.

Для константных областей IgG1 человека, обладающих специфическими мутациями или измененным гликозилированием на остатке Asn297, показано усиление связывания с рецепторами Fc. В некоторых случаях показано также, что эти мутации усиливают ADCC и CDC (Lazar et al., PNAS, 2006, 103; 4005-4010; Shields et al., J. Biol. Chem., 2001, 276; 6591-6604; Nechansky et al., Mol. Immunol., 2007, 44; 1815-1817).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения такие мутации присутствуют в одном или нескольких из положений, выбранных из 239, 332 и 330 (IgG1), или эквивалентных положений в других изоформах IgG. Примерами подходящих мутаций являются S239D и I332E и A330L. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению, описанный в настоящем документе, подвергают мутагенезу в положениях 239 и 332, например S239D и I332E, или в следующем варианте осуществления, его подвергают мутагенезу в трех или более положениях, выбранных из 239 и 332 и 330, например, S239D и I332E и A330L (нумерация по индексу EU).

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения представлено антитело, содержащее константную область тяжелой цепи с измененным профилем гликозилирования, так что антигенсвязывающий белок обладает усиленной эффекторной функцией. Например, где антитело обладает усиленной ADCC или усиленной CDC, или где оно обладает усиленными обеими эффекторными функциями ADCC и CDC. Примеры подходящих способов получения антигенсвязывающих белков с измененным профилем гликозилирования описаны в WO 2003011878, WO 2006014679 и EP 1229125.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к "нефукозилированным" или "афукозилированным" антителам.

Нефукозилированные антитела несут триманнозиловую коровую структуру Fc из N-гликанов ком-

плексного типа без остатков фукозы. Эти гликомодифицированные антитела, лишенные корового фукозного остатка из N-гликанов Fc, могут обладать более сильной ADCC, чем фукозилированные эквиваленты из-за усиления способности связывания с FcγRIII.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела по изобретению, включающему стадии: а) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе, где рекомбинантная клетка-хозяин не содержит α-1,6-фукозилтрансферазы; и б) выделения антигенсвязывающего белка. Рекомбинантная клетка-хозяин может в норме не содержать ген, кодирующий α-1,6-фукозилтрансферазу (например, клетки-хозяева дрожжей, такие как виды *Pichia*), или может являться генетически модифицированной для инактивации α-1,6-фукозилтрансферазы. Доступны рекомбинантные клетки-хозяева, генетически модифицированные для инактивации гена FUT8, кодирующего α-1,6-фукозилтрансферазу. См., например, систему технологий POTELLIGENT™, доступную от BioWa, Inc. (Princeton, N.J.), в которой клетки CHO1SV, лишенные функциональной копии гена FUT8, продуцируют моноклональные антитела, обладающие усиленной активностью антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC), увеличенной относительно идентичного моноклонального антитела, продуцированного в клетке с функциональным геном FUT8. Аспекты системы технологий POTELLIGENT™ описаны в US 7214775, US 6946292, WO 0061739 и WO 0231240. Специалистам в данной области известны также другие подходящие системы.

Специалистам в данной области понятно, что такие модификации можно не только использовать отдельно, но можно использовать в комбинации друг с другом для дополнительного усиления эффекторной функции.

Получение антител с модифицированным гликозилированием.

В другом варианте осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) содержат конкретный паттерн гликозилирования. Например, можно получать афукозилированное или агликозилированное антитело или фрагмент (т.е. антитело, лишенное фукозы или гликозилирования соответственно). Паттерн гликозилирования антитела или фрагмента можно изменять, например, для увеличения аффинности или авидности антитела или фрагмента по отношению к антигену TIGIT. Такие модификации можно проводить, например, посредством изменения одного или нескольких из участков гликозилирования в последовательности антитела или фрагмента. Например, можно осуществлять одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или нескольких участков гликозилирования из каркаса вариативной области, чтобы таким образом исключить гликозилирование в этом участке. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность или авидность антитела или фрагмента для антигена. См., например, патенты США № 5714350 и 6350861.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) могут, кроме того, включать антитела и фрагменты, продуцированные в клетках-хозяевах низших эукариот, в частности в клетках-хозяевах грибов, таких как дрожжи и мицелиальные грибы, которые генетически модифицированы для продукции гликопротеинов, обладающих паттернами гликозилирования, подобными паттернам гликозилирования млекопитающих или человека (см., например, Choi et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5022-5027; Hamilton et al., (2003) Science 301: 1244-1246; Hamilton et al., (2006) Science 313: 1441-1443; Nett et al., Yeast 28(3):237-52 (2011); Hamilton et al., Curr. Opin. Biotechnol., Oct; 18(5): 387-92 (2007)). Особенным преимуществом этих генетически модифицированных клеток-хозяев над применяемыми в настоящее время линиями клеток млекопитающих является возможность контроля профиля гликозилирования гликопротеинов, продуцированных в клетках, так что можно получать композиции гликопротеинов, где преобладает конкретная структура N-гликана (см., например, патент США № 7029872 и патент США № 7449308). Эти генетически модифицированные клетки-хозяева использовали для продукции антител с преобладанием конкретных структур N-гликанов (см., например, Li et al., (2006) Nat. Biotechnol., 24: 210-215).

В конкретных вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), кроме того, включают антитела и фрагменты, продуцированные в клетках-хозяевах низких эукариот и содержащие фукозилированные и нефукозилированные гибридные и комплексные N-гликаны, включая разветвленные надвое и мультиантенные молекулы, включая, но без ограничения, N-гликаны, такие как GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃ GlcNAc₂; Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃ GlcNAc₂; NANA₍₁₋₄₎Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃ GlcNAc₂.

В конкретных вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), могут содержать антитела или фрагменты, обладающие по меньшей мере одним гибридным N-гликаном, выбранным из группы, состоящей из GlcNAcMan₅ GlcNAc₂; GalGlcNAcMan₅ GlcNAc₂; и NANA-GalGlcNAcMan₅ GlcNAc₂. В конкретных аспектах, гибридный N-гликан является предпочтительным видом N-гликанов в композиции.

В конкретных вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, представ-

ленные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), содержат антитела и фрагменты, обладающие по меньшей мере одним комплексным N-гликаном, выбранным из группы, состоящей из $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. В конкретных аспектах комплексные N-гликаны являются предпочтительными видами N-гликанов в композиции. В следующих аспектах комплексный N-гликан представляет собой конкретный вид N-гликанов, который составляет приблизительно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% из комплексных N-гликанов в композиции. В одном варианте осуществления антитело и его антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем документе, содержат комплексные N-гликаны, где по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% из комплексных N-гликанов содержат структуру $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, где такая структура является афукозилированной. Такие структуры можно получать, например, в модифицированных клетках-хозяевах *Pichia pastoris*.

В конкретных вариантах осуществления N-гликан является фукозилированным. Как правило, фукоза находится на $\alpha 1,3$ -связи с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, на $\alpha 1,6$ -связи с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, на $\alpha 1,2$ -связи с Gal на невосстанавливающем конце N-гликана, на $\alpha 1,3$ -связи с GlcNAc на невосстанавливающем конце N-гликана, или на $\alpha 1,4$ -связи с GlcNAc на невосстанавливающем конце N-гликана.

Таким образом, в конкретных аспектах вышеуказанных гликопротеиновых композиций гликоформа представляет собой фукозу с $\alpha 1,3$ -связью или $\alpha 1,6$ -связью для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$; фукозу с $\alpha 1,3$ -связью или $\alpha 1,4$ -связью для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GalGlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; или фукозу с $\alpha 1,2$ -связью для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из $\text{Gal}(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

В следующих аспектах, антитела (например, гуманизированные антитела) или их антигенсвязывающие фрагменты содержат N-гликаны с высоким содержанием маннозы, включая, но без ограничения, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ или N-гликаны, состоящие из N-гликановой структуры $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

В следующих аспектах вышеуказанного комплексные N-гликаны, кроме того, включают фукозилированные и нефукозилированные разветвленные надвое и мультиантенные молекулы.

Как применяют в настоящем документе, термины "N-гликан" и "гликоформа" используют взаимозаменяемо, и они относятся к N-связанному олигосахариду, например, олигосахариду, присоединенному посредством связи аспарагина-N-ацетилглюкозамина с остатком аспарагина полипептида. N-связанные гликопротеины содержат остаток N-ацетилглюкозамина, связанный с амидным азотом из остатка аспарагина в белке. Преобладающими сахарами, обнаруженными на гликопротеинах, являются глюкоза, галактоза, манноза, фукоза, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и сиаловая кислота (например, N-ацетилнейраминная кислота (NANA)). Процессинг групп сахара происходит ко-трансляционно в просвете ER и продолжается посттрансляционно в комплексе Гольджи для N-связанных гликопротеинов.

N-гликаны обладают общим пентасахаридным кором $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man" обозначает маннозу; "Glc" обозначает глюкозу; и "NAc" обозначает N-ацетил; GlcNAc обозначает N-ацетилглюкозамин). Как правило, структуры N-гликанов представляют с невосстанавливающим концом слева и восстанавливающим концом справа.

Восстанавливающий конец N-гликана представляет собой конец, присоединенный к остатку Asn , содержащему участок гликозилирования, на белке. N-гликаны отличаются в отношении количества ветвей (антенн), содержащих периферические сахара (например, GlcNAc , галактозу, фукозу и сиаловую кислоту), которые добавляют к коровой структуре $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man₃"), обозначаемой также как "триманнозный кор", "пентасахаридный кор" или "олигоманнозный кор". N-гликаны классифицируют в соответствии с их разветвленными составными частями (например, с высоким содержанием маннозы, комплексные или гибридные). Тип N-гликана "с высоким содержанием маннозы" имеет пять или более остатков маннозы. N-гликан "комплексного" типа, как правило, имеет по меньшей мере один GlcNAc , присоединенный к 1,3-маннозному плечу, и по меньшей мере один GlcNAc , присоединенный к 1,6-маннозному плечу "триманнозного" кора. Комплексные N-гликаны могут также иметь остатки галактозы ("Gal") или остатки N-ацетилгалактозамина ("GalNAc"), необязательно, модифицированные сиаловой кислотой или производными (например, "NANA" или "NeuAc", где "Neu" обозначает нейраминную кислоту, и "Ac" обозначает ацетил). Комплексные N-гликаны могут также иметь внутриветвевые замены,

включающие "разветвленный надвое" GlcNAc и коровью фукозу ("Fuc"). Комплексные N-гликаны могут также иметь множественные антенны на "триманнозном коре", часто обозначаемые как "мультиантенные гликаны". "Гибридный" N-гликан имеет по меньшей мере один GlcNAc на конце 1,3-маннозного плеча триманнозного кора и ноль или более остатков маннозы на 1,6-маннозном плече триманнозного кора. Различные N-гликаны также обозначают как "гликоформы".

В отношении комплексных N-гликанов термины "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" и "A2" означают следующее. "G-2" относится к структуре N-гликана, которую можно характеризовать как $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G-1" относится к структуре N-гликана, которую можно характеризовать как $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G0" относится к структуре N-гликана, которую можно характеризовать как $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G1" относится к структуре N-гликана, которую можно характеризовать как $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G2" относится к структуре N-гликана, которую можно характеризовать как $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "A1" относится к структуре N-гликана, которую можно характеризовать как $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; и термин "A2" относится к структуре N-гликана, которую можно характеризовать как $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Если не указано иначе, термины "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" и "A2" относятся к молекулам N-гликана, лишенным фукозы, присоединенной к остатку GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Когда термин включает "F", "F" указывает на то, что молекула N-гликана содержит остаток фукозы на остатке GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Например, G0F, G1F, G2F, A1F, и A2F все указывают на то, что N-гликан, кроме того, включает остаток фукозы, присоединенный к остатку GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Низшие эукариоты, такие как дрожжи и мицелиальные грибы, в норме не продуцируют N-гликаны, содержащие фукозу.

В отношении мультиантенных N-гликанов термин "мультиантенные N-гликаны" относится к N-гликанам, дополнительно содержащим остаток GlcNAc на остатке маннозы, содержащим невосстанавливающий конец на 1,6-плече или на 1,3-плече N-гликана или остаток GlcNAc на каждом из остатков маннозы, содержащим невосстанавливающий конец на 1,6-плече и 1,3-плече N-гликана. Таким образом, мультиантенные N-гликаны можно характеризовать формулами $\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ или $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Термин "1-4" относится к 1, 2, 3 или 4 остаткам.

В отношении разветвленных надвое N-гликанов термин "разветвленный надвое N-гликан" относится к N-гликанам, в которых остаток GlcNAc связан с остатком маннозы на восстанавливающем конце N-гликана. Разветвленный надвое N-гликан можно характеризовать формулой $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, где каждый остаток маннозы связан на его невосстанавливающем конце с остатком GlcNAc. В отличие от этого, когда мультиантенный N-гликан характеризуют как $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, формула показывает, что два остатка GlcNAc связаны с остатком маннозы на невосстанавливающем конце одного из двух плеч N-гликанов, и один GlcNAc остаток связан с остатком маннозы на невосстанавливающем конце другого плеча N-гликана.

Физические свойства антитела.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), могут дополнительно содержать один или несколько участков гликозилирования в вариабельной области либо легкой, либо тяжелой цепи иммуноглобулина. Такие участки гликозилирования могут приводить к увеличенной иммуногенности антитела или фрагмента, или к изменению рК антитела из-за измененного связывания антигена (Marshall et al. (1972) *Annu. Rev. Biochem.*, 41:673-702; Gala and Morrison (2004), *J. Immunol.*, 172:5489-94; Wallick et al. (1988), *J. Exp. Med.*, 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol. Immunol.*, 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит на мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T.

Каждое антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) обладает уникальной изоэлектрической точкой (pI), как правило, попадающей в диапазон pH между 6 и 9,5. pI для антитела IgG1, как правило, попадает в диапазон pH 7-9,5, и pI для антитела IgG4, как правило, попадает в диапазон pH 6-8.

Каждое антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) обладает характерной температурой плавления, где более высокая температура плавления указывает на большую общую стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R. and Manning M.C., (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 3:361-71). Как правило, T_{m1} (температура начального разворачивания) может составлять более 60°C, более 65°C или более 70°C. Температуру плавления антитела или фрагмента можно измерять с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al., (2003) *Pharm. Res.*, 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol. Lett.* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002), *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9).

В следующем варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) выбраны так, чтобы не деградировать быстро. Деградацию антитела или фрагмента можно измерять с использованием капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A.J. and Hughes D.E. (1995) *Anal. Chem.*, 67:3626-32).

В следующем варианте осуществления антитела (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты) и их антигенсвязывающие фрагменты выбраны так, чтобы проявлять минимальные эффекты агрегации, которые могут приводить к запуску нежелательного иммунного ответа и/или к измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, являются приемлемыми антитела и фрагменты с агрегацией 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, или 5% или менее. Агрегацию можно измерять несколькими способами, включая эксклюзионную колонку (СЕК), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ, и светорассеяние).

Конъюгаты антител.

Антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты), также можно конъюгировать с химической группой. Химическая группа может представлять собой, среди прочего, полимер, радиоактивный изотоп или цитотоксический фактор. В конкретных вариантах осуществления химическая группа представляет собой полимер, увеличивающий время полужизни антитела или фрагмента в организме субъекта. Подходящие полимеры включают, но без ограничения, гидрофильные полимеры, включающие, но без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ) (например, ПЭГ с молекулярной массой 2, 5, 10, 12, 20, 30 или 40 кДа), декстран или монометоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ). В Lee et al., (1999) (Bioconj. Chem. 10:973-981) описаны конъюгированные с ПЭГ однопочечные антитела. В Wen et al., (2001) (Bioconj. Chem., 12:545-553) описана конъюгация антител с ПЭГ, присоединенным к хелатору радиоактивных металлов (диэтилентриаминпентауксусной кислоте (ДТРА)).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты) также можно конъюгировать с метками, такими как ⁹⁹Tc, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, ¹³¹I, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ²²⁶Ra, ⁶⁰Co, ⁵⁹Fe, ⁵⁷Se, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Cu, ²¹⁷Pb, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ²³⁴Th и ⁴⁰K, ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ⁵²Ti и ⁵⁶Fe.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты) также можно пэгиллировать, например, для увеличения их биологического времени полужизни (например, в сыворотке). Для пэгиллирования антитела или фрагмента, как правило, проводят реакцию антитела или фрагмента с реакционноспособной формой полиэтиленгликоля (ПЭГ), такой как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. В конкретных вариантах осуществления пэгиллирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичного реакционноспособного водорастворимого полимера). Как применяют в настоящем документе, термин "полиэтиленгликоль" предназначен, чтобы включать любую из форм ПЭГ, которые используют для дериватизации других белков, такую как моно(С1-С10) алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеинимид. В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагмент, подлежащие пэгиллированию, представляют собой агликозилированное антитело или фрагмент. Способы пэгиллирования белков известны в данной области, и их можно применять для антител по изобретению. См., например, EP 0154316 и EP 0401384.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты), также можно конъюгировать с флуоресцентными или хемилюминесцентными метками, включая флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных элементов, флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, изотиоцианат, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталевоый альдегид, флюорескамин, ¹⁵²Eu, дансил, умбеллиферон, люциферин, люминаловая метка, изолюминая метка, метка на основе ароматического сложного эфира акридиния, имидазоловая метка, метка на основе соли акридиния, метка на основе сложного эфира оксалата, метка на основе экворина, 2,3-дигидрофталазиндионы, биотин/авидин, спиновые метки и стабильные свободные радикалы.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированные варианты) также можно конъюгировать с цитотоксическим фактором, таким как дифтерийный токсин, цепь А экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*, цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, α-сарцин, белки и соединения (например, жирные кислоты) *Aleurites fordii*, белки с диантином, белки РАРI, РАРII, и РАР-S *Phytolacca americana*, ингибитор из *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *saponaria officinalis*, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин.

Можно использовать любой способ, известный в данной области, для конъюгации антител и их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированных вариантов) с различными группами, включая способы, описанные в Hunter et al., (1962) *Nature* 144:945; David et al., (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain et al., (1981) *J. Immunol. Meth.*, 40:219; и Nygren J., (1982) *Histochem. и Cytochem.*, 30:407. Способы конъюгации антител и фрагментов являются общепринятыми и очень хорошо известными в данной области.

Терапевтические применения антител против TIGIT.

Далее представлены способы лечения субъектов, включая субъектов-людей, нуждающихся в лечении, с помощью выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем

документе (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированных вариантов). В одном варианте осуществления изобретения такой субъект страдает инфекцией или инфекционным заболеванием. В другом варианте осуществления изобретения такой субъект страдает злокачественной опухолью. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль с инфильтрацией инфильтрирующих в опухоль лимфоцитов, экспрессирующих TIGIT. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой, например, остеосаркому, рабдомиосаркому, нейробластому, рак почки, лейкоз, переходноклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, злокачественную опухоль Вильма, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак предстательной железы, злокачественную опухоль кости, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак желудка, колоректальный рак, рак шейки матки, синовиальную саркому, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному, множественную миелому, почечно-клеточный рак, ретинобластому, гепатобластому, печеночно-клеточную карциному, меланому, рабдоидную опухоль почек, саркому Юинга, хондросаркому, злокачественную опухоль мозга, глиобластому, менингиому, аденому гипофиза, вестибулярную шванному, примитивную нейроэктодермальную опухоль, медуллобластому, астроцитому, анапластическую астроцитому, олигодендроглиому, эпендимому, папиллому хориоидного сплетения, истинную полицитемию, тромбоцитемию, идиопатический миелофиброз, саркому мягких тканей, рак щитовидной железы, рак эндометрия, карциноидную злокачественную опухоль или рак печени, рак молочной железы или рак желудка. В одном из вариантов осуществления изобретения злокачественная опухоль представляет собой метастазирующую злокачественную опухоль, например, из вариантов, описанных выше.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения субъектов с использованием антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению (например, 14А6, 28Н5, 31С6 и их гуманизированных вариантов), где субъект страдает вирусной инфекцией. В одном варианте осуществления вирусная инфекция представляет собой инфекцию вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита (А, В, или С), вируса герпеса (например, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II и CMV, вируса Эпштейна-Барр), аденовируса, вируса гриппа, флавивирусов, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса свинки, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса осповакцины, вируса HTLV, вируса денге, папилломавируса, вируса моллюска, вируса полиомиелита, вируса бешенства, вируса JC или вируса арбовирусного энцефалита.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения субъектов с использованием антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, где субъект страдает бактериальной инфекцией. В одном варианте осуществления бактериальная инфекция представляет собой инфекцию бактериями, выбранными из группы, состоящей из Chlamydia, риккетсиозных бактерий, микобактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков и гонококков, клебсиеллы, протеуса, сerratии, псевдомонад, Legionella, Corynebacterium diphtheriae, Salmonella, бацилл, Vibrio cholerae, Clostridium tetan, Clostridium botulinum, Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Mycobacterium leprae, Mycobacterium lepromatosis и Borriella.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения субъектов с использованием антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, где субъект страдает грибковой инфекцией. В одном варианте осуществления грибковая инфекция представляет собой инфекцию грибом, выбранным из группы, состоящей из Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т.д.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger и т.д.), рода Mucorales (mucor, absidia, rhizopus), Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis и Histoplasma capsulatum.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения субъектов с использованием антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, где субъект страдает паразитической инфекцией. В одном варианте осуществления паразитическая инфекция представляет собой инфекцию паразитом, выбранным из группы, состоящей из Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleria fowleri, Acanthamoeba, Giardia lamblia, Cryptosporidium, Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii и Nippostrongylus brasiliensis.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу предотвращения или ингибирования связывания TIGIT с MHC класса II, усиления активации антигенспецифических Т-клеток или стимуляции продукции интерлейкина-2 Т-клетками у субъекта (например, человека), например, где субъект страдает злокачественной опухолью или инфекционным заболеванием (например, как обсуждают в настоящем документе), включающему введение эффективного количества антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 14А6, 28А5, 31С6 и их гуманизированные варианты), необязательно, в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим средством.

"Субъект" может представлять собой млекопитающее, такое как человек, собака, кошка, лошадь, корова, мышь, крыса, обезьяна (например, яванский макак, например, Macaca fascicularis) или кролик. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой субъекта-человека.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) можно использовать отдельно или в сочетании с другими, дополнительными лекарственными средствами и/или терапевтическими процедурами, для лечения или предотвращения любого заболевания, такого как злокачественная опухоль, например, как обсуждают в настоящем документе, у субъекта, нуждающегося в таком лечении или предотвращении. Композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель, содержащие такие антитела и фрагменты в сочетании с другими лекарственными средствами, также являются частью настоящего изобретения.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), можно использовать отдельно или в сочетании с противоопухолевыми вакцинами.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), можно использовать отдельно или в сочетании с химиотерапевтическими средствами.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), можно использовать отдельно или в сочетании с радиотерапией.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), можно использовать отдельно или в сочетании с направленной терапией. Примеры направленных терапевтических средств включают: гормональную терапию, ингибиторы передачи сигнала (например, ингибиторы EGFR, такие как цетуксимаб (эрбитукс) и эрлотиниб (тарцева)); ингибиторы HER2 (например, трастузумаб (герцептин) и пертузумаб (перьета)); ингибиторы BCR-ABL (такие как иматиниб (гливек) и дазатиниб (спрайсел)); ингибиторы ALK (такие как кризотиниб (ксалкори) и церитиниб (зикадиа)); ингибиторы BRAF (такие как вемурафениб (зелбораф) и дабрафениб (тафинлар)), модуляторы экспрессии генов, индукторы апоптоза (например, бортезомиб (велкад) и карфилзомиб (кипролис)), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб (авастин) и рамуцирумаб (цирамза), моноклональные антитела, присоединенные к токсинам (например, брентуксимаб ведотин (адцетрис) и адо-трастузумаб эмтанзин (кадсила)).

В конкретных вариантах осуществления антитела против TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) можно использовать в комбинации с противораковым лекарственным средством или иммуномодулирующим лекарственным средством, таким как ингибитор иммуномодулирующего рецептора, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с рецептором.

Таким образом, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) в сочетании с пембролизумабом; а также к способам лечения или предотвращения злокачественной опухоли у субъекта, включающим введение эффективного количества антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента и пембролизумаба субъекту. Необязательно, субъекту вводят также дополнительное лекарственное средство.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с выделенным антителом, содержащим тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 33, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 34. SEQ ID NO: 33 и 34 кодируют тяжелую и легкую цепь пембролизумаба.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с выделенным антителом, содержащим тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 35, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36. SEQ ID NO: 35 и 36 кодируют тяжелую и легкую цепь ниволумаба.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с одним или несколькими из: антитела против PD1 (например, пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба (CT-011)), антитела против PDL1, антитела против CTLA4, антитела против CS1 (например, элотузумаба), антитела против KIR2DL1/2/3 (например, лирилумаба), антитела против CD137 (например, урелумаба), антитела против GITR (например, TRX518), антитела против PD-L1 (например, BMS-936559, MSB0010718C или MPDL3280A), антитела против PD-L2, антитела против ILT1, антитела против ILT2, антитела против ILT3, антитела против ILT4, антитела против ILT5, антитела против ILT6, антитела против ILT7, антитела против ILT8, антитела против CD40, антитела против OX40, антитела против ICOS, антитела против SIRP α , антитела против KIR2DL1, антитела против KIR2DL2/3, антитела против KIR2DL4, антитела против KIR2DL5A, антитела против KIR2DL5B, антитела против

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против KIR2DL2/3.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против KIR2DL4.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против KIR2DL5A.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против KIR2DL5B.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против KIR3DL1.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против KIR3DL2.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против KIR3DL3.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против NKG2A.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против NKG2C.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против ICOS.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против SIRP α .

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против 4-1BB.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против IL-10.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с антителом против TSLP.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с IL-10 или пэгилированным IL-10.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с одним или несколькими из ингибитора (например, малой органической молекулы или антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента), такого как: ингибитор MTOR (мишень для рапамицина у млекопитающих), цитотоксического средства, средства на основе платины, ингибитора EGFR, ингибитора VEGF, стабилизатора микротрубочек, таксана, ингибитора CD20, ингибитора CD52, ингибитора CD30, ингибитора RANK (рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B), ингибитора RANKL (лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B), ингибитора ERK, ингибитора MAP-киназы, ингибитора АКТ, ингибитора MEK, ингибитора PI3K, ингибитора HER1, ингибитора HER2, ингибитора HER3, ингибитора HER4, ингибитора Bcl2, ингибитора CD22, ингибитора CD79b, ингибитора ErbB2 или ингибитора фарнезил-протеинтрансферазы.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с любым одним или несколькими из: 13-цис-ретиноевой кислоты, 3-[5-(метилсульфонилпиперадинметил)индолил]хинолона, 4-гидрокситамоксифена, 5-дезоксинуридина, 5'-дезоксипентофуридина, 5-фторурацила, 6-меркаптопурина, 7-гидрокситаурополина, А-443654, абира-теронацетата, абраксана, АВТ-578, аколбифена, ADS-100380, ALT-110, алтретамина, амифостина, ами-

ноглутетимида, амрубицина, амсакрина, анагрелида, анастрозола, ангиостатина, AP-23573, ARQ-197, арзоксифена, AS-252424, AS-605240, аспарагиназы, AT-9263, атрасентана, акситиниба, AZD1152, вакцины на основе бациллы Кальметта-Герена (BCG), батабулина, BC-210, безодутокса, бевацизумаба, бикалутамида, Bio111, BIO140, блеомицина, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, бортезимиба, бузерелина, бусульфана, кальцитриола, камптотецина, канертиниба, капцитабина, карбоплатина, кармустина, CC8490, цедираниба, CG-1521, CG-781, хламидоцина, хлорамбуцила, хлоротоксина, цилегтида, цимитидина, цисплатина, кладрибина, клодроната, COL-3, CP-724714, циклофосфамида, ципротерона, ацетата ципротерона, цитарабина, цитозинарабинозида, декарбазина, дациноста, дактиномицина, далотузумаба, данусертиба, дзатаниба, даунорубицина, декатаниба, дегуелина, денилейкина, дезоксикоформицина, депсипептида, диарилпропионитрила, диэтилстилбестрола, дифтитокса, доцетаксела, довитиниба, доксорубицина, дролоксифена, эдотекарина, меченного иттрием-90 эдотреотида, эдотреотида, ЕКВ-569, EMD121974, эндостатина, энзалутамида, энзастаурина, эпирубицина, эпителина В, ERA-923, эрбитукса, эрлотиниба, эстрадиола, эстрамустина, этопозиды, эверолимуса, экземестана, фиклатузумаба, финастериды, флавопиридола, флоксуридина, флударабина, флудрокортизона, флуоксиместерона, флутамида, схемы лечения FOLFOX, фулвестранта, галетерона, гефитиниба, гемцитабина, гиматекана, гозерелина, ацетата гозерелина, госсипола, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, гидроксипрогестеронкапроата, гидроксимочевина, IC87114, идарубицина, идоксифена, ифосфамида, IM862, иматиниба, IMC-1C11, INCB24360, INO1001, интерферона, интерлейкина-12, ипилимумаба, иринотекана, JNJ-16241199, кетоконазола, KRX-0402, лапатиниба, лазофоксифена, лектрозола, лейковорина, леупролида, ацетата леупролида, левамизола, заключенного в липосомы паклитаксела, ломустина, лонафарниба, луантона, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY317615, маримастата, мехлорэтамина, медроксипрогестеронацетата, магестролацетата, мелфалана, меркаптопурина, месны, метотрексата, митрамицина, митомидина, митотана, митоксантрона, тозасертиба, MLN8054, неовастат, нератиниба, нейрадиба, нилотиниба, нилутимида, нолатрекседа, NVP-BE235, облимерсена, октреотида, офатумумаба, ореговомаба, ортеронела, оксалиплатина, паклитаксела, палбоциклиба, памидроната, панитумумаба, пазопаниба, PD0325901, PD184352, ПЭГ-интерферона, пеметрекседа, пентостатина, перифозина, фенилаланиниприта, PI-103, пиктилисиба, PIK-75, пипендоксифена, PKI-166, пликамицина, порфимера, преднизона, прокарбазина, прогестинов, PX-866, R-763, ралоксифена, ралтитрексида, разоксина, ридафоролимуса, ритуксимаба, ромидепсина, RTA744, рубитекана, скриптейда, Sdx102, селициклиба, селуметиниба, семаксаниба, SF1126, сиролимуса, SN36093, сорафениба, спиронолактона, свкаламина, SR13668, стрептозоцина, SU6668, субериоланилида гидроксамовой кислоты, сунитиниба, синтетического эстрогена, талампанела, талимогена лагерпарепвека, тамоксифена, темозололмида, темсиролимуса, тенипозиды, тесмилифена, тестостерона, тетрандрин, TGX-221, талидомида, тиогуанина, тиотепа, тицилимумаба, типифарниба, тивозаниба, TKI-258, TLK286, топотекана, цитрата торемифена, трабектедина, трастузумаба, третиноина, трихостатина А, моногидрата трицирибинфосфата, памоата трипторелина, TSE-424, урамустина, вальпроевой кислоты, валрубицина, вандетаниба, ваталаниба, VEGF-ловушки, винбластин, винкристина, виндезина, винорелбина, викаксина, витеспана, вориностата, VX-745, вортманнина, Xg311, занолумумаба, ZK186619, ZK-304709, ZM336372, ZSTK474.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с одним или несколькими противорвотными средствами, включая, но без ограничения: касопитант (GlaxoSmithKline), нетупитант (MGI-Helsinn) и другие антагонисты рецептора NK-1, палоносетрон (продаваемый как Aloxi в MGI Pharma), апрепитант (продаваемый как Emend в Merck и Co.; Rahway, NJ), дифенгидрамин (продаваемый как Benadryl® в Pfizer; New York, NY), гидроксизин (продаваемый как Atarax® в Pfizer; New York, NY), метоклопрамид (продаваемый как Reglan® в AN Robins Co.; Richmond, VA), лоразепам (продаваемый как Ativan® в Wyeth; Madison, NJ), альпразолам (продаваемый как Xanax® в Pfizer; New York, NY), галоперидол (продаваемый как Haldol® в Ortho-McNeil; Raritan, NJ), дроперидол (Inapsine®), дронабинол (продаваемый как Marinol® в Solvay Pharmaceuticals, Inc.; Marietta, GA), дексаметазон (продаваемый как Decadron® в Merck и Co.; Rahway, NJ), метилпреднизолон (продаваемый как Медрол® в Pfizer; New York, NY), прохлорперазин (продаваемый как Compazine® в Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), гранизетрон (продаваемый как Kytril® в Hoffmann-La Roche Inc.; Nutley, NJ), ондансетрон (продаваемый как Zofran® в Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), долазетрон (продаваемый как Anzemet® в Sanofi-Aventis; New York, NY), трописетрон (продаваемый как Navoban® в Novartis; East Hanover, NJ).

Другие побочные эффекты лечения злокачественных опухолей включают дефицит эритроцитов и лейкоцитов. Соответственно, в одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) присутствует в сочетании с средством, осуществляющим лечение или предотвращение такого дефицита, например, таким как филграстим, ПЭГ-филграстим, эритропоэтин, эпоэтин α или дарбепоэтин α .

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты)

вводят в сочетании с противораковой радиотерапией. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения радиотерапия представляет собой наружную дистанционную лучевую терапию (ЕВТ): способ доставки пучка рентгеновских лучей высокой энергии к локализации опухоли. Пучок получают вне организма пациента (например, посредством линейного ускорителя) и нацеливают на участок опухоли. Эти рентгеновские лучи могут разрушать клетки злокачественных опухолей, и тщательное планирование обработки позволяет сберечь окружающие нормальные ткани. Никаких источников радиоактивности не помещают внутрь организма пациента. В одном из вариантов осуществления изобретения радиотерапия представляет собой протонную терапию: тип конформной лучевой терапии с бомбардировкой пораженной заболеванием ткани протонами вместо рентгеновских лучей. В одном из вариантов осуществления изобретения радиотерапия представляет собой конформную наружную дистанционную лучевую терапию: способ, в котором используют передовую технологию, чтобы подстраивать радиотерапию под строение организма индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения радиотерапия представляет собой брахитерапию: временное помещение радиоактивных веществ в организм, как правило, применяемое для приложения к области дополнительной дозы или дополнительной интенсивности радиации.

В одном из вариантов осуществления изобретения хирургическая процедура, применяемая в сочетании с антителом против TIGIT или его антигенсвязывающим фрагментом (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированными вариантами), представляет собой хирургическое удаление опухоли.

Термин "в сочетании с" указывает на то, что компоненты, вводимые способом по настоящему изобретению (например, антитело против TIGIT (например, гуманизированное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) вместе с пембролизумабом) можно составлять в одну композицию для одновременного введения или составлять отдельно в две или более композиции (например, набор). Каждый компонент можно вводить субъекту в момент времени, отличный от момента времени, когда вводят другой компонент; например, каждое введение можно проводить не одновременно (например, отдельно или последовательно) в несколько интервалов на протяжении данного периода времени. Более того, отдельные компоненты можно вводить субъекту одинаковыми или различными способами.

Экспериментальные и диагностические применения.

Антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), можно использовать в качестве средств для аффинной очистки. В этом процессе антитела к TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты иммобилизуют на твердой фазе, такой как сефадекс, стекло или агарозная смола, или фильтровальная бумага, с использованием способы хорошо известны в данной области. Иммобилизованное антитело или фрагмент приводят в контакт с образцом, содержащим белок TIGIT (или его фрагмент), подлежащий очистке, и затем подложку промывают подходящим растворителем, который может удалять, по существу, весь материал в образце, за исключением белка TIGIT, который связан с иммобилизованным антителом или фрагментом. Наконец, подложку промывают растворителем, элюирующим связанный TIGIT (например, белок А). Иммобилизованные антитела и фрагменты составляют часть настоящего изобретения.

Представлены также антигены для получения вторичных антител, которые можно использовать например, для проведения Вестерн-блоттинга и других иммунологических анализов, обсуждаемых в настоящем документе. В частности, описаны полипептиды, которые содержат переменные области и/или последовательности CDR терапевтического антитела, описанного в настоящем документе (например, 14A6, 28H5 или 31C6), и которые можно использовать для получения антител против идиотипов для применения в специфической детекции присутствия антитела, например, в терапевтическом контексте.

Антитела против TIGIT (например, гуманизированные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты также можно использовать в диагностических анализах белка TIGIT, например детекции его экспрессии в специфических клетках, тканях или сыворотке, например клетках опухолей, таких как клетки меланомы. Такие диагностические способы можно использовать в диагностике различных заболеваний.

Настоящее изобретение относится к анализам ELISA (твердофазным иммуоферментным анализам), включающим применение антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе (например, 14A6 или его гуманизированный вариант).

Например, такой способ включает следующие стадии:

- (a) покрытие субстрата (например, поверхности лунки микропланшета для титрования, например, пластикового планшета) антителом против TIGIT или его антигенсвязывающим фрагментом;
- (b) нанесение образца, подлежащего тестированию на присутствие TIGIT, на субстрат;
- (c) промывка планшета, так что удаляется несвязанный материал в образце;
- (d) введение меченных поддающейся детекции меткой антител (например, связанных с ферментом антител), которые также являются специфическими для антигена TIGIT;
- (e) промывка субстрата, так что удаляются несвязанные, меченные антитела;
- (f) если меченые антитела являются связанными с ферментом, введение химического вещества, превращаемого ферментом в флуоресцентный сигнал; и
- (g) детекция присутствия меченого антитела.

Детекция метки, ассоциированной с субстратом, указывает на присутствие белка TIGIT.

В следующем варианте осуществления меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым с помощью пероксидазы, которая вступает в реакцию с ABTS (например, 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислотой)) или 3,3', 5,5'-тетраметилбензидином для получения изменения окраски, которое поддается детекции. Альтернативно, меченное антитело или фрагмент является меченым с помощью поддающегося детекции радиоактивного изотопа (например, ^3H), который можно детектировать посредством сцинтилляционного счетчика в присутствии сцинтиллятора.

Антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) можно использовать в способе Вестерн-блоттинга или иммуноблоттинга белков. Такой способ является частью настоящего изобретения и включает, например:

(1) необязательно, перенос белков из образца, подлежащего тестированию на присутствие TIGIT (например, после электрофоретического разделения белков в образце посредством PAGE или SDS-PAGE), на мембрану или другой твердый субстрат с использованием способа, известного в данной области (например, полусухого блоттинга или блоттинга в резервуаре); приведение мембраны или другого твердого субстрата, подлежащего тестированию на присутствие связанного TIGIT или его фрагмента, в контакт с антителом против TIGIT или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению.

Такая мембрана может принимать форму мембраны на основе нитроцеллюлозы или винила (например, поливинилиденфторида (PVDF)), на которую перенесены белки, подлежащие тестированию на присутствие TIGIT в геле для денатурирующего PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле) или в геле для SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) (например, после электрофоретического разделения в геле). Перед приведением мембраны в контакт с антителом против TIGIT или фрагмента, мембрану, необязательно, блокируют, например, с помощью обезжиренного сухого молока или т.п., чтобы связать неспецифические участки связывания белка на мембране.

(2) промывку мембраны один или несколько раз для удаления не связавшегося антитела против TIGIT или фрагмента и других не связавшихся веществ; и

(3) детекцию связанного антитела против TIGIT или фрагмента.

Детекция связанного антитела или фрагмента указывает на то, что белок TIGIT присутствует на мембране или субстрате и в образце. Детекцию связанного антитела или фрагмента можно проводить посредством связывания антитела или фрагмента с вторичным антителом (антителом против иммуноглобулина), меченым поддающейся детекции меткой, и, затем детекции присутствия вторичного антитела.

Антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), также можно использовать для иммуногистохимии. Такой способ составляет часть настоящего изобретения и включает, например:

(1) приведение клетки (например, клетки опухоли, такой как клетка меланомы), подлежащей тестированию на присутствие белка TIGIT, в контакт с антителом против TIGIT или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и

(2) детекцию антитела или фрагмента на или в клетке.

Если собственно антитело или фрагмент является меченым поддающейся детекции меткой, его можно детектировать напрямую. Альтернативно, антитело или фрагмент можно связывать с меченым поддающейся детекции меткой вторичным антителом, которое детектируют.

Конкретные антитела против TIGIT и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), также можно использовать для визуализации опухолей *in vivo*. Такой способ может включать инъекцию радиоактивно меченого антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента, в организм пациента, подлежащего тестированию на присутствие опухоли, ассоциированной с экспрессией TIGIT (например, экспрессирующей TIGIT, например, на поверхности клеток опухоли), с последующей радионуклидной визуализацией организма пациента для детекции присутствия меченого антитела или фрагмента, например, в участках, содержащих высокую концентрацию антитела или фрагмента, связанных с опухолью. Детекция участков указывает на присутствие TIGIT+ опухолей и клеток опухолей.

Способы визуализации включают визуализацию SPECT (однофотонную эмиссионную компьютерную томографию) или визуализацию PET (позитронную эмиссионную томографию). Метки включают, например, иод-123 (^{123}I) и технеций-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), например, в сочетании с визуализацией SPECT или ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O или ^{18}F , например, в сочетании с визуализацией PET, или индий-111 (см., например, Gordon et al., (2005) *International Rev. Neurobiol.*, 67:385-440).

Фармацевтические композиции и введение.

Для получения фармацевтических или стерильных композиций антител против TIGIT и антигенсвязывающих фрагментов по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем. См., например, Remington's *Pharmaceutical Sciences* и U.S. *Pharmacopeia*: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Составы терапевтических и диагностических средств можно получать посредством смешивания с

подходящими носителями, наполнителями или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Токсичность и терапевтическую эффективность антител по изобретению, введенных отдельно или в комбинации с другим лекарственным средством, можно определять посредством стандартных фармацевтических способах в культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс (LD₅₀/ED₅₀). Данные, полученные из этих анализов культур клеток и исследований на животных, можно использовать в составлении диапазона дозирования для применения у человека. Доза таких соединений предпочтительно лежит в диапазоне циркулирующих концентраций, включающем ED₅₀ с небольшой токсичностью или с отсутствием токсичности. Доза может меняться в пределах этого диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и способа введения.

В следующем варианте осуществления дополнительное лекарственное средство вводят субъекту в сочетании с антителом против TIGIT или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6) в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (November 1, 2002)).

Способ введения может меняться. Способы введения включают пероральное, ректальное, трансмукозальное, кишечное, парентеральное; внутримышечное, подкожное, внутрикожное, интрамедуллярное, интратекальное, прямое интравентрикулярное, внутривенное, внутрибрюшинное, интраназальное, внутриглазное, ингаляцию, инфуляцию, местное, кожное, чрескожное или внутриартериальное.

В конкретных вариантах осуществления антитела против TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) можно вводить инвазивным способом, например посредством инъекции. В следующих вариантах осуществления изобретения антитело против TIGIT, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, внутримышечно, внутриартериально, внутрь опухоли или посредством ингаляции, аэрозольной доставки. Введение неинвазивными способами (например, перорально; например, в пилюлях, капсулах или таблетках) также включено в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к сосуду (например, пластиковому или стеклянному флакону, например, с крышкой, или хроматографической колонке, полый игле или цилиндру шприца), содержащему любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) или их фармацевтическую композицию. Настоящее изобретение также относится к устройству для инъекции, содержащему любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты) или их фармацевтическую композицию. Устройство для инъекций представляет собой устройство, вводящее вещество в организм пациента парентеральным способом, например внутримышечным, подкожным или внутривенным. Например, устройство для инъекции может представлять собой шприц (например, предварительно заполненный фармацевтической композицией, такой как шприц для самоинъекции), который, например, включает цилиндр или баллон для содержания жидкости, подлежащей инъекции (например, антитело или фрагмент, или его фармацевтическая композиция), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции жидкости; и поршень для выталкивания жидкости из цилиндра и через отверстие иглы. В одном из вариантов осуществления изобретения устройство для инъекции, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, или его фармацевтическую композицию, представляет собой устройство для внутривенной (в/в) инъекции. Такое устройство содержит антитело или фрагмент, или их фармацевтическую композицию, в канюле или трокаре/игле, которые можно присоединять к трубке, которую можно присоединять к пакету или резервуару для содержания жидкости (например, солевого раствора; или лактированного раствора Рингера, содержащего NaCl, лактат натрия, KCl, CaCl₂ и необязательно, включающего глюкозу), вводимой в организм пациента через канюлю или трокар/иглу. Антитело или фрагмент, или их фармацевтическую композицию можно, в одном из вариантов осуществления изобретения, вводить в устройство после того, как трокар и канюля вставлены в вену субъекта, и трокар удален из вставленной канюли. В/в устройство можно, например, вставлять в периферическую вену (например, в руке или плече); верхнюю полую вену или нижнюю полую вену или в правое предсердие сердца (например, центральный внутривенный катетер); или в подключичную, внутреннюю яремную или бедренную вену и, например, продвигать по направлению к сердцу, пока оно не достигнет верхней полой вены или правого предсердия (например, центральный венозный катетер). В одном из вариантов осуществления изобретения устройством для инъекции представляет собой шприц для самоинъекции; безыгольное устройство для инъекции или внешний

инфузионный насос. В безыгольном устройстве для инъекции используют узкую струю жидкости под высоким давлением, которая проникает в эпидермис для введения антитела или фрагмента, или их фармацевтической композиции в организм пациента. Внешние инфузионные насосы представляют собой медицинские устройства, доставляющие антитело или фрагмент, или их фармацевтическую композицию в организм пациента в контролируемых количествах. Внешние инфузионные насосы можно приводить в действие электрически или механически. Различные насосы действуют различными способами, например шприцевой насос удерживает жидкость в резервуаре шприца, и подвижный поршень контролирует доставку жидкости, эластомерный насос удерживает жидкость в растяжимом баллонном резервуаре, и давление эластичных стенок баллона управляет доставкой жидкости. В перистальтическом насосе набор роликов осуществляет сжатие по длине гибкой трубки, проталкивая жидкость вперед. В многоканальном насосе жидкости можно доставлять из множества резервуаров с различной скоростью.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также можно вводить с помощью гиподермического безыгольного устройства для инъекции; такого как устройства, описанные в патентах США № 6620135; 6096002; 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Такие безыгольные устройства, содержащие фармацевтическую композицию, также составляют часть настоящего изобретения. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также можно вводить посредством инфузии. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для введения фармацевтических композиций включают примеры, описанные в патенте США № 4487603, где описан имплантируемый насос для микроинфузии для распределения лекарственного средства с контролируемой скоростью; патенте США № 4447233, где описан насос для инфузии лекарственного средства для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патенте США № 4447224, где описано имплантируемое устройство для инфузии с переменным потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; патенте США № 4439196, где описана осмотическая система доставки лекарственного средства, обладающая многокамерными отсеками. Множество других имплантатов, систем и модулей для доставки хорошо известны специалистам в данной области, и те из них, которые содержат фармацевтические композиции по настоящему изобретению, включены в объем настоящего изобретения.

Альтернативно, можно вводить антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) местным, а не системным способом, например посредством инъекции антитела или фрагмента непосредственно в опухоль, например в TIGIT⁺ опухоль. Более того, можно вводить антитело или фрагмент в систему направленной доставки лекарственного средства, например, в липосому, покрытую тканеспецифическим антителом, нацеленным, например, на опухоль, например на TIGIT⁺ опухоль, например, характеризующуюся иммунопатологией. Липосомы могут быть нацелены на пораженную ткань и избирательно поглощаться пораженной тканью. Такие способы и липосомы составляют часть настоящего изобретения.

Режим введения зависит от нескольких факторов, включая скорость обмена терапевтического антитела или антигенсвязывающего фрагмента в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность терапевтического антитела и доступность клеточ-мишеней в биологическом матриксе.

Предпочтительно, режим введения обеспечивает доставку достаточного количества терапевтического антитела или фрагмента для эффекта улучшения намеченного состояния заболевания, с одновременной минимизацией нежелательных побочных эффектов. Соответственно, количество доставляемого биологического средства частично зависит от конкретного терапевтического антитела и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Доступны руководства по выбору подходящих доз терапевтических антител или фрагментов (см., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios. Scientific. Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) *New Engl. J. Med.*, 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.*, 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.*, 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Определение подходящей дозы проводит медицинский работник, например, с использованием параметров или факторов, как известно, или как подозревают в данной области, влияющих на лечение. Как правило, дозирование начинают с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и затем увеличивают его с небольшим шагом, пока не будет достигнут желательный эффект или оптимальный эффект относительно любых отрицательных побочных эффектов. Важные диагностические измерения включают измерения симптомов, например воспаления или уровня продукции воспалительных цитокинов. Как правило, является желательным, чтобы биологическое средство, которое будет использовано, происходило из того же вида, что и животное, намеченное для лечения, чтобы таким образом минимизировать любой иммунный ответ на реагент. В случае субъектов-людей, например гуманизированные и полностью человеческие антитела могут являться желательными.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, 14A6, 28H5, 31C6 и их гуманизированные варианты), можно предоставлять посредством непрерывной инфузии или посредством доз, вводимых, например, ежесуточно, 1-7 раз в неделю, еженедельно, раз в

две недели, раз в месяц, раз в два месяца, раз в квартал, раз в полгода, ежегодно и т.д. Дозы можно вводить, например, внутривенно, подкожно, местно, перорально, интраназально, ректально, внутримышечно, интрацеребрально, интраспинально или посредством ингаляции. Общая еженедельная доза, как правило, составляет по меньшей мере 0,05 мкг/кг массы тела, более обычно по меньшей мере 0,2, 0,5, 1, 10, 100 мкг/кг, 0,25, 1,0, 2,0 мг/кг, 5,0, 10, 25, 50 мг/кг или более (см., например, Yang et al. (2003) *New Engl. J. Med.*, 349:427-434; Herold et al. (2002) *New Engl. J. Med.*, 346:1692-1698; Liu et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji et al. (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:151-144). Дозы также можно предоставлять для достижения предопределенной намеченной концентрации антитела против TIGIT в сыворотке субъекта, такой как 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 мкг/мл или более. В других вариантах осуществления антитело против TIGIT по настоящему изобретению вводят, например, подкожно или внутривенно, на основании введения раз в неделю, раз в две недели, "каждые 4 недели", раз в месяц, раз в два месяца, или раз в квартал 10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 или 2500 мг/субъекта.

Как применяют в настоящем документе, термин "эффективное количество" обозначает количество антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению (например, гуманизованного 14A6 или гуманизованного 28H5), которое при введении отдельно или в комбинации с дополнительным лекарственным средством в клетку, в ткань или субъекту является эффективным, чтобы вызывать поддающееся измерению улучшение одного или нескольких симптомов заболевания, например злокачественной опухоли или прогрессирования злокачественной опухоли. Эффективная доза, кроме того, относится к количеству антитела или фрагмента, достаточному, чтобы приводить, по меньшей мере, к частичному улучшению состояния симптомов, например уменьшению размера или уничтожению опухоли, отсутствию роста опухоли, увеличенной продолжительности выживания. При применении для индивидуального активного ингредиента, вводимого отдельно, эффективная доза относится к одному этому ингредиенту. При применении для комбинации эффективная доза относится к объединенным количествам активных ингредиентов, которые приводят к терапевтическому эффекту, вводимых либо в комбинации, либо сериями, либо одновременно. Эффективное количество лекарственного средства приводит к улучшению диагностического измерения или параметра по меньшей мере на 10%; как правило, по меньшей мере на 20%; предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 30%; более предпочтительно по меньшей мере на 40% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 50%. Эффективное количество может также приводить к улучшению субъективного критерия в случаях, когда субъективные критерии используют для оценки тяжести заболевания.

Наборы.

Далее представлены наборы, содержащие один или несколько компонентов, которые включают, но без ограничения, антитело против TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент, как обсуждают в настоящем документе (например, гуманизованное 14A6 или гуманизованное 28H5 или гуманизованное 31C6) в сочетании с одним или несколькими дополнительными компонентами, включая, но без ограничения, фармацевтически приемлемый носитель и/или лекарственное средство, как обсуждают в настоящем документе. Антитело, или фрагмент, и/или лекарственное средство можно составлять в форме чистой композиции или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, в фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления набор содержит антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, гуманизованное 14A6, или гуманизованное 28H5, или гуманизованное 31C6), или их фармацевтическую композицию в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе) и их фармацевтическую композицию и/или лекарственное средство в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

В другом варианте осуществления набор содержит комбинацию по изобретению, включающую антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, гуманизованное 14A6 или гуманизованное 28H5 или гуманизованное 31C6) вместе с фармацевтически приемлемым носителем, необязательно, в комбинации с один или несколькими лекарственными средствами, составленные вместе, необязательно, в фармацевтической композиции, в одном общем контейнере.

Если набор включает фармацевтическую композицию для парентерального введения субъекту, набор может включать устройство для проведения такого введения. Например, набор может включать одну или несколько гиподермических игл или других устройств для инъекции, как указано выше.

Набор может включать вкладыш в упаковку, содержащий информацию относительно фармацевтических композиций и лекарственных форм в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и терапевтам, чтобы использовать вложенные фармацевтические композиции и лекарственные формы эффективно и безопасно. Например, следующая информация относительно комбинации по изобретению может быть предоставлена на вкладыше: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, профилактические меры, неблагоприятные реакции, передозировка, правильные дозировка и введение, форма выпуска, подходящие условия хранения, ссылки, информация о производителе/поставщике и патентная информация.

Наборы для детекции и терапевтические наборы.

Для удобства, антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 14A6, 28H5, 31C6 или их гуманизированные варианты) можно предоставлять в наборе, т.е. упакованной комбинации реагентов в predetermined количествах с инструкциями для проведения диагностического или детектирующего анализа. Когда антитело или фрагмент являются мечеными с помощью фермента, набор может включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, обеспечивающий поддающийся детекции хромофор или флуорофор). Кроме того, можно включать другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или буфер для лизиса) и т.п. Относительные количества различных реагентов можно менять для обеспечения концентраций реагентов в растворе, которые в значительной степени оптимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты можно предоставлять в форме сухих порошков, как правило, лиофилизированных, включая наполнители, которые при растворении обеспечивают раствор реагентов, обладающий соответствующей концентрацией.

Представлены также реагенты и наборы для диагностики или детекции, содержащие один или несколько таких реагентов для применения во множестве анализов для детекции, включая, например, иммунологические анализы, такие как ELISA (сэндвич-типа или конкурентного формата). Компоненты набора можно предварительно связывать с твердой подложкой, или можно наносить на поверхность твердой подложки, когда набор используют. В некоторых вариантах осуществления изобретения средства для получения сигнала могут поступать предварительно связанными с антителом или фрагментом по изобретению или могут требовать комбинации с одним или несколькими компонентами, например буферами, конъюгатами антитело-фермент, субстратами для ферментов или т.п., перед использованием. Наборы также могут включать дополнительные реагенты, например блокирующие реагенты для уменьшения неспецифического связывания с поверхностью твердой фазы, реагенты для промывки, субстраты для ферментов и т.п. Поверхность твердой фазы может находиться в форме пробирки, бусины, микропланшета для титрования, микросферы, или других материалов, подходящих для иммобилизации белков, пептидов или полипептидов. В конкретных аспектах фермент, катализирующий образование хемилуминесцентного или хромогенного продукта или расход хемилуминесцентного или хромогенного субстрата, является компонентом средств получения сигнала. Такие ферменты хорошо известны в данной области. Наборы могут содержать любые из средств для связывания и реагентов для детекции, описанных в настоящем документе. Необязательно, набор может также содержать инструкции для осуществления способов по изобретению.

Представлен также набор, содержащий антитело против TIGIT (например, гуманизированное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент, упакованные в контейнер, такой как флакон или бутылка, и дополнительно содержащий этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную с контейнером, где на этикетке описано содержание контейнера и представлены показания и/или инструкции относительно применения содержания контейнера для лечения одного или нескольких состояний заболевания, как описано в настоящем документе.

В одном аспекте набор предназначен для лечения злокачественной опухоли и содержит антитело против TIGIT (например, гуманизированное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительное лекарственное средство или вакцину. Набор может, необязательно, дополнительно содержать шприц для парентерального, например внутривенного, введения. В другом аспекте набор содержит антитело против TIGIT (например, гуманизированное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент, и этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную с контейнером, описывающую применение антитела или фрагмента с вакциной или дополнительным лекарственным средством. В другом аспекте набор содержит вакцину или дополнительное лекарственное средство и этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную с контейнером, описывающую применение вакцины или дополнительного лекарственного средства с антителом против TIGIT или фрагмента. В конкретных вариантах осуществления антитело против TIGIT и вакцина или дополнительное лекарственное средство находятся в отдельных флаконах или объединены вместе в одной и той же фармацевтической композиции.

Как указано выше в разделе комбинированная терапия, параллельное введение двух лекарственных средств не требует того, чтобы средства вводили одновременно или посредством одного и того же способа, при условии, что существует перекрывание периодов времени, во время которых средства проявляют их терапевтический эффект. Предусмотрено одновременное или последовательное введение, как и введение в различные сутки или недели.

Можно получать также терапевтические наборы и наборы для детекции, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере одно из антитела, пептида, антигенсвязывающего фрагмента или полинуклеотида, описанных в настоящем документе, и инструкции для использования композиции в качестве реагента для детекции или лекарственного средства. Контейнеры для применения в таких наборах могут, как правило, включать по меньшей мере один флакон, тестовую пробирку, колбу, бутылку, шприц или другой подходящий контейнер, в который можно помещать одну или несколько из композиций (композиций) для детекции и/или терапевтической композиции (композиций), и предпочтительно, подходящим образом разделять на аликваты. Когда предоставляют также второе лекарственное средство, набор может содержать также второй отдельный контейнер, в который можно помещать эту вторую

композицию для детекции и/или терапевтическую композицию.

Альтернативно, можно получать множество соединений в одной фармацевтической композиции, и можно упаковывать в одно контейнерное средство, такое как флакон, колба, шприц, бутылка, или другой подходящий один контейнер. Наборы, описанные в настоящем документе, могут, как правило, включать средства для содержания флакона(флаконов) с плотной фиксацией для коммерческой продажи, например, такие как отлитые или полученные с помощью формования с раздувом и растяжением пластиковые контейнеры, в которых сохраняют желательный флакон(ы). Когда радиоактивная метка, хромогенная, флуорогенная или другой тип поддающейся детекции метки или средств для детекции включены в набор, средство для мечения либо может быть предоставлено в том же контейнере, что и сама композиция для детекции или терапевтическая композиция, либо альтернативно может быть помещено во второе отдельное контейнерное средство, в котором эта вторая композиция может быть помещена и подходящим образом разделена на аликвоты. Альтернативно, реагент для детекции и метку можно получать в отдельных контейнерных средствах, и в большинстве случаев набор может также, как правило, включать средства для содержания флакона(флаконов) с плотной фиксацией для коммерческой продажи и/или удобной упаковки и доставки.

Представлены также устройство или аппарат для осуществления способов детекции или мониторинга, описанных в настоящем документе. Такой аппарат может включать камеру или пробирку, в которую можно помещать образец, систему разлива жидкостей, необязательно, включающую клапаны или насосы, чтобы направлять поток образца через устройство, необязательно, фильтры для отделения плазмы или сыворотки от крови, смесительные камеры для добавления связывающих средств или реагентов для детекции, и необязательно, детектирующее устройство для детекции количества поддающейся детекции метки, связанной с иммунокомплексом связывающего средства. Поток образца может быть пассивным (например, посредством капиллярных, гидростатических или других сил, не требующих дополнительных манипуляций с устройством после нанесения образца), или активным (например, посредством приложения силы, полученной посредством механических насосов, электроосмотических насосов, центробежной силы или увеличенного давления воздуха), или посредством комбинации активных и пассивных сил.

В следующих вариантах осуществления представлен также процессор, машиночитаемая память и стандартная последовательность действий, сохраняемая в машиночитаемой памяти и адаптированная для выполнения процессором для осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе. Примеры подходящих компьютерных систем, окружения и/или конфигураций включают персональные компьютеры, компьютеры-серверы, портативные или переносные устройства, многопроцессорные системы, микропроцессорные системы, компьютерные приставки, программируемую потребительскую электронику, сетевые PC, миникомпьютеры, центральные компьютеры, распределенную вычислительную среду, включающую любые из вышеуказанных систем или устройств, или любые другие системы, известные в данной области.

Общие способы.

Стандартные способы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные способы представлены также в Ausbel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, где описаны клонирование в клетках бактерий и мутагенез ДНК (Vol. 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжей (Vol. 2), гликоконъюгаты и экспрессия белка (Vol. 3) и биоинформатика (Vol. 4).

Описаны способы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию, (Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение слитых белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16,0,5-16,22,17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech. (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны получение, очистка, и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, выше). Доступны стандартные способы для характеристики взаимодействий лиганд/рецептор (см., например, Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Можно получать моноклональные, поликлональные и гуманизированные антитела (см., например, Sheperd and Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenter et

al. (2000) *J. Immunol.*, 165:6205; He et al. (1998) *J. Immunol.*, 160:1029; Tang et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877-883; Foote and Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 224:487-499; патент США № 6329511).

Альтернативным гуманизации является использование библиотек человеческих антител, экспонированных на фагах, или библиотек человеческих антител в трансгенных мышах (Vaughan et al. (1996) *Nature Biotechnol.*, 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000) *Immunol. Today*, 21:371-377; Barbas et al. (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

Описаны одноцепочечные антитела и диатела (см., например, Malecki et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:213-218; Conrath et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:7346-7350; Desmyter et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:26285-26290; Hudson and Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; и патент США № 4946778). Представлены бифункциональные антитела (см., например, Mack et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods*, 248:7-15; Volkel et al. (2001) *Protein Engineering*, 14:815-823; Segal et al. (2001) *J. Immunol. Methods*, 248:1-6; Brennan et al. (1985) *Science* 229:81-83; Raso et al. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Trauneker et al. (1991) *EMBO J.*, 10:3655-3659; и патенты США № 5932448, 5532210 и 6129914).

Представлены также биспецифические антитела (см., например, Azzoni et al. (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita et al. (1999) *J. Immunol.*, 162:6901; Merchant et al. (2000) *J. Biol. Chem.*, 274:9115; Pandey et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:12999; Propst et al. (2000) *J. Immunol.*, 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

Очистка антигена не является необходимой для получения антител. Животных можно иммунизировать клетками, несущими представляющий интерес антиген. Затем спленоциты можно выделять из иммунизированных животных, и спленоциты можно сливать с линией клеток миеломы для получения гибридомы (см., например, Meyaard et al. (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright et al. (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston et al., выше; Kaithamana et al. (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Антитела можно конъюгировать, например, с низкомолекулярными лекарственными средствами, ферментами, липосомами, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Антитела можно использовать для терапевтических, диагностических целей, в наборе или для других целей, и они включают антитела, связанные, например, с красителями, радиоактивными изотопами, ферментами или металлами, например коллоидным золотом (см., например, Le Doussal et al. (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini et al. (1998) *J. Immunol.*, 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) *J. Immunol.*, 162:2804-2811; Everts et al. (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Доступны способы проточной цитометрии, включая активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS), (см., например, Owens et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Доступны флуоресцентные реагенты, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, включая праймеры и зонды из нуклеиновой кислоты, полипептиды, и антитела, для использования, например, в качестве диагностических реагентов (Molecular Probes (2003) Каталог, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) Каталог, St. Louis, MO).

Описаны стандартные способы гистологии иммунной системы (см., например, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Доступны пакеты программного обеспечения и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, сворачивания белков, функциональных доменов, участков гликозилирования и выравнивания последовательностей (см., например, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne et al. (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne et al. (2000) *Bioinformatics Applications Note*, 16:741-742; Wren et al. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.*, 68:177-181; von Heijne (1983) *Fur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14:4683-4690).

Пример 1. Получение антител крысы и мыши против hTIGIT.

Для получения антител против TIGIT человека крысы Lewis иммунизировали рекомбинантным белком - меченным his TIGIT человека из Sino Biologicals Кат. № 10917-H08H) - с использованием адьюванта RIBI и инъекции в подушечку стопы по расписанию раз в две недели. Альтернативно, мышей Balb/C иммунизировали рекомбинантным белком - меченным Fc человека TIGIT человека - с использованием адьюванта RIBI и инъекции в подушечку стопы по расписанию раз в две недели. У иммунизированных животных отбирали кровь и определяли титры сыворотки для связывания с трансфицированными TIGIT

человека клетками CHO-K1 с использованием ELISA на основе клеток (описанного ниже). Животных с наивысшими титрами подвергали конечной бустер-инъекции рекомбинантным белком, и дренирующие подколенные лимфатические узлы выделяли через четверо суток. Гибридомы получали посредством электрослияния выделенных лимфоцитов с партнером по слиянию миеломой P3X63-AG8.653 с использованием системы для электрослияния Cytospulse Hybriimmune. Слитые клетки высевали в 96-луночные планшеты в DMEM/F12, 15% BCS, NAT, IL-6, добавку OPI и гентамицин.

Супернатанты гибридом анализировали по связыванию с экспрессирующими TIGIT человека клетками CHO-K1 и перекрестной реакционной способности по отношению к экспрессирующим TIGIT макака-резуса клеткам CHO с использованием формата ELISA на основе клеток. Экспрессирующие TIGIT человека и TIGIT макака-резуса клетки CHO-K1 высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток в 50 мкл DMEM/F12, 10% BCS и гентамицина (среда CHO-K1). Клетки высевали либо при 2×10^4 клеток/луночку за двое суток до анализа, либо при 4×10^4 клеток/луночку за одни сутки до анализа. Среду удаляли из лунок до анализа и добавляли 50 мкл супернатанта гибридомы. Супернатанты гибридомы инкубировали в течение 30-60 мин при комнатной температуре и промывали 3 раза с помощью PBS/0,05% Tween 20 с использованием протокола промывки ELISA на клетках в промывателе для планшетов Biotek EL405x Select CW. 50 мкл антитела для детекции (конъюгированного с HRP антитела козы против IgG крысы (Southern Biotech кат. № 3030-05) или конъюгированного с HRP антитела козы против IgG мыши (Southern Biotech кат. № 1043-05)), добавляли в разведении 1:2000 в среде CHO-K1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30-60 мин. Планшеты для анализа промывали, как выше, и проявляли с использованием TMB, и останавливали реакцию с помощью останавливающего раствора для TMB (KPL кат. № 50-85-06) или 0,1N фосфорной кислоты. Определяли оптическую плотность при 450-620 нм. Положительные клоны являлись реакционноспособными по отношению к клеткам CHO-K1, трансфицированным как TIGIT человека, так и TIGIT макака-резуса, и являлись отрицательными по связыванию с исходными клетками CHO-K1. В этих анализах, если для антитела показывали связывание с исходными (нетрансфицированными) клетками CHO-K1; авторы настоящего изобретения отбрасывали это антитело при скрининге как не специфическое для TIGIT.

Положительные гибридомы субклонировали посредством лимитирующего разведения или субклонировали посредством посева гибридом на полутвердые среды, и отбора клонов на ClonePix® (Genetix). Два цикла субклонирования проводили для исходных гибридом. Конечные субклоны выращивали в мелкомасштабных культурах в бессывороточной среде для получения гибридом и очищали для получения очищенного антитела для дальнейшей характеристики.

С использованием этих способов получили приблизительно 819 гибридом.

Пример 2. Характеризация антител против hTIGIT.

Супернатанты из положительных клонов тестировали на их способность блокировать связывание рекомбинантного белка CD155 человека - huFc с клетками CHO-K1 с hTIGIT в формате ELISA на основе клеток. Клетки TIGIT-CHO-K1 человека высевали в 96-луночные планшеты, как описано выше. Среду удаляли из планшетов и 50 мкл супернатанта гибридомы инкубировали с клетками CHO-K1 с TIGIT человека при 4°C в течение 30 мин. 50 мкл CD155 человека - huFc добавляли в планшет до конечной концентрации 0,5 мкг/мл CD155 человека - huFc и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Планшеты для анализа промывали 3 раза с помощью PBS/0,05% Tween-20, как выше. Связывание CD155 человека - huFc с клетками hTIGIT-CHO-K1 детектировали с использованием конъюгата с HRP вторичного антитела F(ab)₂ козы против IgG человека (Jackson 109-036-098) в разведении 1:2000 в среде CHO-K1. Планшеты проявляли с использованием TMB и останавливали реакцию с помощью останавливающего раствора для TMB, как описано выше, и определяли A450-620 нм.

Антитело крысы, полученное в соответствии с вышеописанным способом, обозначено как 14A6, и происходит из клона LB155.14A6.G2.A8. Это антитело крысы (14A6) принадлежит к изотипу IgG2/Kappa и содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 7 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO: 8. Очищенное антитело 14A6 связывается с TIGIT человека и TIGIT макака-резуса, как определено по связыванию с клетками CHO-K1 с TIGIT человека и TIGIT макака-резуса посредством ELISA на основе клеток (фиг. 1) с использованием способов, описанных выше. (Для контрольного антитела того же изотипа не показано какого-либо связывания (данные не представлены)). Очищенное антитело 14A6 может также блокировать взаимодействие hTIGIT и hCD155 с использованием анализа блокирования ELISA на основе клеток (фиг. 3) с использованием способа, описанного выше.

Антитело мыши, полученное в соответствии с вышеописанным способом, обозначено как 28H5, и происходит из клона TC167.28H5.H5. Это антитело мыши (28H5) принадлежит к изотипу IgG1/каппа и содержит переменную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 и переменную область легкой цепи из SEQ ID NO: 64. Очищенное антитело 28H5 также связывается с TIGIT человека и TIGIT макака-резуса, как определено по связыванию с клетками CHO-K1 с TIGIT человека и TIGIT макака-резуса посредством ELISA на основе клеток (фиг. 2) с использованием способов, описанных выше. Очищенное антитело 28H5 также блокирует взаимодействие hTIGIT и hCD155 с использованием анализа блокирования ELISA на основе клеток (фиг. 3) с использованием способа, описанного выше.

Другое антитело мыши, полученное в соответствии с вышеописанным способом, обозначено как 31С6, и происходит из клона МЕВ125.31С6.А1,205. Это антитело мыши (31С6) принадлежит к изотипу IgG1/каппа и содержит варибельную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 94 и варибельную область легкой цепи из SEQ ID NO: 95. Очищенное антитело 31С6 также связывается с TIGIT человека и TIGIT макака-резуса, как определено по связыванию с клетками CHOK1 с TIGIT человека и TIGIT макака-резуса посредством ELISA на основе клеток (фиг. 4) с использованием способов, описанных выше. Очищенное антитело 31С6 антитело также блокирует взаимодействие hTIGIT и hCD155 с использованием анализа блокирования ELISA на основе клеток (фиг. 4) с использованием способа, описанного выше.

Определение аффинности связывания исходного (не относящегося к человеку) антитела против TIGIT с рекомбинантным белком с TIGIT человека.

Кинетику активности связывания антител против TIGIT человека 14А6 и 31С6 (полученных, как описано в пример 1) и коммерческого антитела MBSA43 измеряли посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Приблизительно 5000 РЕ антитела против IgG мыши, GE Healthcare, каталожный номер BR-1008-38, или приблизительно 13000 РЕ специфического для фрагмента антитела козы против Fc-гамма IgG крысы, Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 112-006-071, иммобилизовали посредством химических реакций присоединения по аминокгруппе на сенсорном чипе CM5 серии S, каталожный номер BR-1005-30. Каждый из клонов антител мыши против TIGIT человека 31С6 и MBSA43, инъецировали над поверхностями иммобилизованных антител против антител мыши при 1 мкг/мл до уровня связывания 40 РЕ. Клон антител крысы против TIGIT человека 14А6 инъецировали над поверхностями иммобилизованных антител против антител крысы при 1 мкг/мл до уровня связывания 40 РЕ. Буфер HBS-EP+ (BR-1006-69) использовали в качестве рабочего буфера со скоростью потока 30 мкл/мин. Различные концентрации белка TIGIT человека-His или белка TIGIT-Fc в диапазоне от 0,29 до 40 нМ, при скорости потока 45 мкл/мин инъецировали над поверхностями антител. После каждого цикла инъекции антител мыши против TIGIT человека для клонов 31С6 и MBSA43, поверхность чипа CM5 серии S регенерировали с использованием одной трехминутной инъекции 10 мМ глицина pH 1,7 при скорости потока 10 мкл/мин. После каждого цикла инъекции антител крысы против TIGIT человека поверхность чипа CM5 серии S регенерировали с использованием одной 20-секундной инъекции 10 мМ глицина pH 1,5 с последующими двумя 10-секундными инъекциями 12,5 мМ NaOH при скорости потока 60 мкл/мин.

Сенсограммы с вычитанием фонового связывания использовали для анализа константы скорости связывания (k_a) и диссоциации (k_d), и равновесной константы диссоциации K_D . Полученные наборы данных приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 Лэнгмюра с использованием программного обеспечения для оценки данных Biacore T200 (версии 2.0). В табл. 3 обобщены аффинности антител против TIGIT человека для белка TIGIT человека-His и белка TIGIT-Fc.

Таблица 3. Измерение аффинности антител против TIGIT человека с белком TIGIT человека-His и белком TIGIT-Fc с использованием BIACore

Клон	KD по BIACore (TIGIT человека-His) (нМ)	KD по BIACore (TIGIT человека-Fc) (нМ)
14А6 (rIgG2a/K)	3,09	3,12
31С6 (mIgG1/K)	34,4	10,9
Сравнительное MBSA43 (mIgG1)	36,3	16,5

Пример 3. Анализ активности Т-клеток *in vitro* для антагонистических антител против hTIGIT.

Из тестированных антител приблизительно для 352 моноклональных антител, как показано, блокирующих связывание CD155-Fc с клетками CHO, экспрессирующими hTIGIT, проводили скрининг по их способности усиливать активность Т-клеток *in vitro* с использованием функциональных анализов на основе клеток.

Один анализ авторы настоящего изобретения разработали для характеристики функциональных последствий блокирования рецептора TIGIT человека с использованием клеток Jurkat, иммортализованной линии клеток Т-лимфоцитов человека (клон Е6-1; ATCC TIB-152), сконструированной для сверхэкспрессии TIGIT человека (hTIGIT-Jurkat), которые культивировали совместно с клетками THP-1, линией моноцитарных клеток человека в присутствии или в отсутствие одного из лигандов TIGIT, CD155 и CD112. Клетки hTIGIT-Jurkat, культивированные совместно с клетками THP-1 и стимулированные связанным с планшетом mAb против CD3, продуцируют IL-2, но когда лиганд TIGIT (CD155 или CD112) добавляли в совместную культуру, уровни IL-2 уменьшались зависимым от лиганда образом. Обработка антителами, блокирующими взаимодействие CD155- или CD112-TIGIT, такими как коммерчески доступное Ab против hTIGIT, клон MBSA43 (eBioscience Кат. № 12-9500-42), восстанавливает продукцию IL-2 в этом анализе зависимым от дозы образом (фиг. 5).

96-луночные плоскодонные планшеты покрывали антителом мыши против CD3 человека (1 мкг/мл

в PBS; клон НТ3а; BD Pharmingen Кат. № 555336) в течение ночи при 4°C. На следующие сутки клетки hTIGIT-Jurkat (50000) высевали в предварительно покрытые планшеты и проводили предварительную инкубацию в течение 30-60 мин с mAb в различных концентрациях. Клетки ТНР-1 (50000) добавляли в культуру, затем либо CD155-Fc (ECD CD155 человека, слитый с Fc человека; 1,0 мкг/мл), либо CD112-Fc (ECD CD112 человека, слитый с Fc человека; 0,5 мкг/мл). После инкубации в течение 18-24 ч при 37°C и 5,0% CO₂, уровни IL-2 оценивали в культуральных супернатантах посредством Meso Scale (Набор Human IL-2 Tissue Culture MESO: Кат. № K151АНВ-2). Обработка MBSA43 (10 мкг/мл) восстанавливала IL-2 до уровня, равного уровню, когда активированные клетки hTIGIT Jurkat культивируют с ТНР-1 в отсутствие CD155 или CD112.

Как показано на фиг. 5, при титровании антитела против hTIGIT, клона 14А6, от 30 мкг/мл со снижением до 0,04 мкг/мл, получили EC₅₀ 0,190 мкг/мл по сравнению с MBSA43 при 0,24 мкг/мл с использованием этого анализа. Клон 14А6 (30 мкг/мл) восстанавливал уровень IL-2 до 82% от MBSA43 (10 мкг/мл).

На фиг. 5 показано также, что при титровании антитела против hTIGIT, клона 28Н5, от 30 мкг/мл со снижением до 0,04 мкг/мл, получили EC₅₀ 0,24 мкг/мл по сравнению с MBSA43 при 0,24 мкг/мл с использованием этого анализа.

На фиг. 6 показано также, что при титровании антитела против hTIGIT, клона 31С6, от 30 мкг/мл со снижением до 0,04 мкг/мл, получили EC₅₀ 0,14 мкг/мл по сравнению с MBSA43 при 0,24 мкг/мл с использованием этого анализа. Клон 31С6 (30 мкг/мл) восстанавливал уровень IL-2 до 118% от MBSA43 (10 мкг/мл).

Из 352 тестируемых моноклональных антител, приблизительно 113 являлись способными усиливать активность Т-клеток *in vitro* с использованием функциональных анализов на основе клеток.

Пример 4. Анализ активности Т-клеток *in vitro* для антагонистических антител против hTIGIT.

Авторы настоящего изобретения далее анализировали относительный функциональный антагонизм TIGIT и восстановление активации Т-клеток и эффекторной функции с использованием первичной линии Т-клеток человека, экспрессирующей эндогенный TIGIT при активации Т-клеточного рецептора (TCR). Линия Т-клеток человека ВС4-клона 49 представляет собой специфический для аллоантигена клон CD4⁺ Т-клеток человека, экспрессирующий TCR, специфический для молекул МНС HLA-класса II, экспрессированный на трансформированной EBV линии клеток, JY (HLA-DR1,4). Линия Т-клеток человека ВС4-клона 49 требует повторной стимуляции аллоантигеном каждые две недели, с использованием облученных (5000 рад (50 Гр)) стимулирующих клеток JY, облученных РВМС (4000 рад (40 Гр)), выделенных из двух лейкоцитарных слоев, и РНА-Р (2,5 мкг/мл; Sigma), а также 10 нг/мл IL-2 человека (R&D), добавляемого каждые 3-4 суток после повторной стимуляции и размножения. Несколько клонов Т-клеток (BC1-6, BC4-27, BC4-49) анализировали посредством ПЦР и затем посредством проточной цитометрии по относительной экспрессии TIGIT после повторной стимуляции, и выбрали ВС4-клон 49, поскольку он обладал наивысшей экспрессией TIGIT по сравнению с другими клонами. Относительную экспрессию и кинетику TIGIT, CD226, CD96 и CD155 мониторировали после повторной стимуляции облученными (5000 рад (50 Гр)) стимулирующими клетками JY, облученными РВМС и РНА-Р, для оценки наилучшего времени для анализа mAb-антагонистов по относительной антагонистической активности по отношению к TIGIT. Пик экспрессии TIGIT наблюдали через 3-4 суток после повторной стимуляции, в то время как экспрессия CD226 и CD96 уменьшалась на протяжении того же периода времени. Затем экспрессия TIGIT уменьшалась, в то время как экспрессия CD226 и CD96 снова увеличивалась на сутки 6 после повторной стимуляции (фиг. 7). Соответственно, mAb - кандидаты на антагонисты TIGIT - оценивали через 3-4 суток после повторной стимуляции. Трансфектант JY, сверхэкспрессирующий CD155 человека, получали с использованием ретровирусных векторов рМХ->huTIGIT в качестве средств для супрессии ответов Т-клеток ВС4-клона 47 в биологическом анализе первичных Т-клеток и для оценки относительной способности mAb против TIGIT проявлять антагонизм активации TIGIT посредством CD155 и восстанавливать пролиферацию Т-клеток и IFN γ через трое суток.

Анализ первичных Т-клеток по относительному антагонизму mAb против hTIGIT проводили следующим образом, линию CD4⁺ Т-клеток человека ВС4-клона 49 совместно культивировали с блокирующими CD155-Fc mAb, специфическими для hTIGIT, в различных концентрациях (33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 и 0,1 мкг/мл) в течение 30 мин и затем рассеивали в круглодонные 96-луночные планшеты (2 \times 10⁴ с/луноку). Трансфектанты JY-hCD155, экспрессирующие аллоантиген и высокие уровни hCD155, облучали (5000 рад (50 Гр)), промывали и затем добавляли в лунки, содержащие обработанные mAb против TIGIT Т-клетки ВС4-клона 49, до конечной концентрации 1 \times 10⁴ (в соотношении 2:1 Т-клетка:клетка-мишень) или 5 \times 10³ (в соотношении 1:4 Т-клетка: клетка-мишень) в общем объеме 200 мкл/луноку. Контроль включал отсутствие обработки mAb, совместное культивирование с обработанными mAb того же изотипа Т-клетками, только Т-клетки и только клетки JY-CD155. Через трое или четверо суток совместного культивирования супернатанты собирали для количественной оценки цитокина интерферона-гамма (IFN γ), и Т-клетки обрабатывали 6 ч трифторидом для оценки относительной пролиферации.

Как показано на фиг. 8А и 8В, обработка mAb против hTIGIT 14А6, 28Н5 и 31С6 Т-клеток ВС4-

клона 49 приводила к восстановлению ответов IFN γ и пролиферативных ответов, как оценено по увеличенным ответам по сравнению с обработанными антителом того же изотипа и необработанными Т-клетками. Для коммерческого антитела MBSA43 и антител 37D10 и 25G10 (антитела против TIGIT, полученные, как описано в примере 1) также показана активность в этом анализе. Увеличение продукции IFN γ после обработки 14A6, 28H5 и 31C6 было в среднем приблизительно в 2 раза.

Пример 5. Противоопухолевая активность антител против TIGIT и против PD1 в модели опухоли на животных.

Мыши: самок мышей BALB/cAnN в возрасте приблизительно семь-восемь недель со средней массой тела 20 г получали из Taconic Laboratory (Germantown, NY). Общепринятый корм для животных и воду предоставляли без ограничений.

Реагенты-антитела: моноклональное антитело мыши изотипа IgG1 против PD-1 мыши и контрольное антитело того же изотипа получали из внешних источников в форме замороженных (-80°C) исходных растворов. Антитело крысы против TIGIT мыши (GIGD7) получали из eBioscience в форме исходного раствора при 4°C. Контрольное антитело изотипа IgG1 представляло собой моноклональное антитело мыши, специфическое для аденовирусного гексона 25. Контрольное антитело изотипа IgG2a представляло собой моноклональное антитело крысы, специфическое для бета-галактозидазы. Изотип IgG1 мыши является мышинным эквивалентом изотипа для человеческого изотипа IgG4.

Составы реагентов-антител: буферы составов являлись специфическими для каждого антитела, чтобы стабилизировать белки и предотвращать осаждение. Составы являлись следующими: mIgG1: 75 mM NaCl, 10 mM фосфат натрия, 3% сахароза, pH 7,3; антитело против PD-1: 20 mM ацетат натрия, 7% сахароза, pH 5,5; IgG2a крысы: 20 mM ацетат натрия, 9% сахароза pH 5,5; и антитело против TIGIT (GIGD7): PBS pH 7,0.

Получение и имплантация линии клеток опухоли: клетки карциномы ободочной кишки CT26 культивировали в среде RPMI, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сывороткой. 3×10^5 находящихся в логарифмической фазе и субконфлюэнтных клеток CT26 инъецировали подкожно (п/к) в объеме 100 мкл бессывороточной RPMI в нижнюю заднюю часть правого бока каждой мыши. Мышей сначала выбривали с использованием электронной машинки в области, подлежащей использованию для имплантации.

CT-26 представляет собой линию клеток колоректальной аденокарциномы мыши, сингенной для линии мыши BALB/c. CT-26 является подходящей модельной системой для оценки механизма действия антитела против PD-1 благодаря транслируемому молекулярному профилю этой опухоли после терапии антителом против PD-1.

Измерения опухоли и массы тела: опухоли измеряли за сутки до первой дозы и дважды в неделю после. Длину и ширину опухоли измеряли с использованием электронного штангенциркуля, и объем опухоли определяли с использованием формулы $\text{объем (мм}^3\text{)} = 0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$, где длина представляет собой более длинное измерение. Мышей периодически взвешивали для мониторинга общего состояния здоровья, а также для оценки фактической дозы доставки в мг/кг на мышью, при необходимости. Перед обработкой мышью взвешивали и измеряли опухоли индивидуальных мышей. Для предотвращения смещения любых выпадающих по массе или объему опухоли мышью удаляли и оставшихся мышью случайным образом распределяли по различным группам лечения с эквивалентным средним размером опухоли. Когда средний объем опухоли у несущих опухоль CT26 мышью достигал $\sim 100 \text{ мм}^3$, приблизительно через 7 суток после имплантации, животных случайным образом распределяли по различным группам лечения по 10 мышью на группу, и начинали дозирование. Животным проводили дозирование в концентрациях, указанных ниже.

Получение, введение и анализ растворов для дозирования: замороженные исходные растворы антител, подлежащих тестированию в модели на животных, размораживали и переносили во влажный лед. Чтобы исключить повторное замораживание и размораживание, каждый флакон исходного раствора размораживали один раз и разделяли на аликвоты в объемах, достаточных для однократного использования. Полипропиленовые пробирки с низкой адгезией использовали для этой цели. Аликвоты быстро замораживали в сухом льду и сохраняли при -80°C. Перед каждым дозированием одну аликвоту размораживали и разводили до номинальной концентрации в подходящем разбавителе и проводили дозирование немедленно. Аликвоты растворов для дозирования быстро замораживали и хранили при -80°C до анализов. Растворы для дозирования оценивали с использованием платформы Meso Scale Discovery (MSD®, Rockville, MD), основанной на технологии множественных массивов; комбинации электрохемилюминесцентной детекции и структурированных массивов.

Результаты лечения с дозированием антител против TIGIT/против PD1: несущим опухоль CT26 мышам BALB/cAnN вводили антитела крысы против TIGIT мыши (GIGD7) в дозе 20 мг/кг, IP, каждые 4 суток в течение каждого из 5 циклов. Антитела против PD-1 мыши (описанные выше) вводили в дозе 10 мг/кг, IP, каждые 4 суток в течение каждого из 5 циклов. После дозирования, животных продолжали мониторить, и объемы опухолей измеряли до 36 суток. Лечение начинали, когда средний размер опухоли достигал 100 мм^3 ($75\text{-}115 \text{ мм}^3$). Опухоли измеряли дважды в неделю. Как демонстрируют результа-

ты, показанные на фиг. 9, средний противоопухолевый ответ при комбинированной терапии антагонистом PD-1 и антагонистом TIGIT превышал противоопухолевый ответ, наблюдаемый при монотерапии либо антителом против PD1 ($p < 0,05$), либо антителом против TIGIT ($p < 0,005$). Для монотерапии антителом против TIGIT, 21% ингибирование роста опухоли (TGI) наблюдали на сутки 14. Для монотерапии антителом против PD1, 52% TGI наблюдали на сутки 14. Комбинированное лечение приводило к 85% TGI на сутки 14, и показано 40% случаев полной регрессии (CR), так что никаких поддающихся измерению опухолей не осталось у 4 из 10 мышей на сутки 36. Противоопухолевая эффективность с любым антителом, вводимым в форме монотерапии, составляла 0-10% CR.

Пример 6. Гуманизация антител.

Крысиное антитело 14A6 и мышинное антитело 31C6 гуманизировали с использованием способов, описанных в описании. Из крысиного антитела 14A6 конструировали следующие гуманизированные переменные тяжелые цепи: SEQ ID NO: 9-24 и SEQ ID NO: 37-47; и конструировали следующие гуманизированные переменные легкие цепи: SEQ ID NO: 25-30 и SEQ ID NO: 48-52. Из мышинного антитела 31C6, конструировали следующие гуманизированные переменные тяжелые цепи: SEQ ID NO: 124-129; и конструировали следующие гуманизированные переменные легкие цепи: SEQ ID No: 130-133.

Пример 7. Эффект изотипа Fc на противоопухолевую активность антител против TIGIT в модели опухоли на животных.

Мыши: самок мышей BALB/cAnN в возрасте приблизительно семь-восемь недель со средней массой тела 20 г получали из Taconic Laboratory (Germantown, NY). Общепринятый корм для животных и воду предоставляли без ограничений.

Реагенты-антитела:

антитело мыши против PD1 мыши - подтип IgG1;

антитело крысы против TIGIT мыши (18G10) - подтип IgG1 крысы. Это антитело описано на фигурах как исходное 18G10. Антитело 18G10 обладает последовательностью VH из SEQ ID NO: 136 и последовательностью VL из SEQ ID NO: 137;

химерное антитело крысы против TIGIT мыши (18G10), содержащее мышиную Fc-область подтипа mIgG1. Это антитело описано на фигурах как 18G10-G2a. (Изотип IgG1 мыши является мышинным изотипом, эквивалентным человеческому изотипу IgG4.);

химерное антитело крысы против TIGIT мыши 18G10 содержащее мышиную Fc-область подтипа mIgG2a. Это антитело описано на фигурах как 18G10-G2a. (Изотип IgG2a мыши является мышинным изотипом, эквивалентным человеческому изотипу IgG1.);

контрольное антитело для изотипа IgG1 мыши (совпадающее по изотипу IgG1 мыши контрольное моноклональное антитело, специфическое для аденовирусного гексона 25));

контрольное антитело для изотипа IgG1 крысы (совпадающее по изотипу IgG1 крысы контрольное моноклональное антитело, специфическое для IL-4 человека);

контрольное антитело для изотипа IgG2a мыши (совпадающее по изотипу IgG2a мыши контрольное моноклональное антитело, специфическое для аденовирусного гексона 25).

Составы реагентов-антител: составы являлись следующими:

mIgG1: 75 mM NaCl, 10 mM фосфат натрия, 3% сахара, pH7,4;

антитело против PD-1: 20 mM ацетат натрия, 9% сахара, pH5,5; mIgG2a: 75 mM NaCl, 10 mM фосфат натрия, 3% сахара, pH7,3;

IgG1 крысы: 20 mM ацетат натрия, 7% сахара pH 5,5; 18G10: 20 mM NaAc, 100 mM NaCl, 3% сахара; 18G10-G1: 20 mM NaAc, 9% сахара, pH 5,5; 18G10-G2a: 20 mM NaAc, 9% сахара, pH 5,5.

Получение и имплантация линии клеток опухоли: клетки карциномы ободочной кишки CT26 культивировали в среде RPMI, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сывороткой. 3×10^5 находящихся в логарифмической фазе и субконфлюэнтных клеток CT26 инъецировали подкожно (п/к) в объеме 100 мкл бессывороточной RPMI в нижнюю заднюю часть правого бока каждой мыши. Мышей сначала выбривали с использованием электронной машинки в области, подлежащей использованию для имплантации.

CT-26 представляет собой линию клеток колоректальной аденокарциномы мыши, сингенной для линии мыши BALB/c. CT-26 является подходящей модельной системой для оценки механизма действия антитела против PD-1 благодаря транскрируемому молекулярному профилю этой опухоли после терапии антителом против PD-1.

Измерения опухоли и массы тела: опухоли измеряли за сутки до первой дозы и дважды в неделю после. Длину и ширину опухоли измеряли с использованием электронного штангенциркуля, и объем опухоли определяли с использованием формулы $\text{объем (мм}^3\text{)} = 0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$, где длина представляет собой более длинное измерение. Мышей периодически взвешивали для мониторинга общего состояния здоровья, а также для оценки фактической дозы доставки в мг/кг на мышью при необходимости. Перед обработкой мышью взвешивали и измеряли опухоли индивидуальных мышью. Для предотвращения смещения любых выпадающих по массе или объему опухоли мышью удаляли и оставшихся мышью случайным образом распределяли по различным группам лечения с эквивалентным средним размером

опухоли.

Получение, введение и анализ растворов для дозирования: замороженные исходные растворы антител, подлежащих тестированию в модели на животных, размораживали и переносили во влажный лед. Чтобы исключить повторное замораживание и размораживание, каждый флакон исходного раствора размораживали один раз и разделяли на аликвоты в объемах, достаточных для однократного использования. Полипропиленовые пробирки с низкой адгезией использовали для этой цели. Аликвоты быстро замораживали в сухом льду и сохраняли при -80°C . Перед каждым дозированием одну аликвоту размораживали и разводили до номинальной концентрации в подходящем разбавителе и проводили дозирование немедленно. Аликвоты растворов для дозирования быстро замораживали и хранили при -80°C до анализов. Растворы для дозирования оценивали с использованием платформы Meso Scale Discovery (MSD®, Rockville, MD), основанной на технологии множественных массивов; комбинации электрохемилюминесцентной детекции и структурированных массивов.

Результаты лечения с дозированием антител против TIGIT/против PD1: несущих опухоль CT26 мышей BALB/cAnN случайным образом распределяли на 10 групп лечения, когда средний объем опухоли этих мышей достигал среднего размера опухоли 100 мм^3 ($80\text{-}119\text{ мм}^3$):

- (1) контроль для изотипа muIgG1 + контроль для изотипа IgG1 крысы;
- (2) контроль для изотипа muIgG1+контроль для изотипа muIgG2a;
- (3) muDX400+контроль для изотипа IgG1 крысы;
- (4) muDX400+контроль для изотипа muIgG2a;
- (5) контроль для изотипа muIgG1+18G10;
- (6) контроль для изотипа muIgG1+18G10-G1;
- (7) контроль для изотипа muIgG1+18G10-G2a;
- (8) muDX400+18G10;
- (9) muDX400+18G10_G1;
- (10) muDX400+18G10_G2a.

Животным вводили антитела крысы против TIGIT мыши (18G10) или химерные антитела против TIGIT 18G10-G1 или 18G10-G2a (описанные выше) в дозе 18 мг/кг, IP, каждые 4 суток в течение каждого из 6 циклов. Антитела против PD-1 мыши (описанные выше) вводили в дозе 10 мг/кг, IP, каждые 4 суток в течение каждого из 6 циклов. После дозирования животных продолжали наблюдать, и объемы опухолей измеряли до 76 суток для некоторых групп лечения. Опухоли измеряли дважды в неделю. Результаты показаны на фиг. 10 и 11. Для монотерапии антителом против TIGIT с использованием 18G10-G2a, показано 44% ингибирование роста опухоли (TGI) на сутки 13; в то время как для исходного антитела 18G10 показано 38%, и для антитела 18G10-G1 показано 36%. Для монотерапии антителом против PD1 в комбинации с контролем для изотипа rIgG1, 51% TGI наблюдали на сутки 13. Когда антитело против PD-1 комбинировали с контролем для изотипа muIgG2a, 50% TGI и 10% случаев полной регрессии (CR) наблюдали на сутки 18, так что наблюдали 1 полный ответ из 10 животных. Для комбинации антитела против PD1 и исходного 18G10 показано 80% TGI на сутки 13 и показано 300% CR на сутки 39. Для комбинации антитела против PD1 и 18G10-G1 показано 59% TGI на сутки 13 и показано 10% CR на сутки 13. Для комбинации антитела против PD1 и 18G10-G2a показано 88% TGI на сутки 13 и показано 60% CR на сутки 63. Для комбинации антитела против PD1 и 18G10-G2a показаны большая противоопухолевая активность и более полная регрессия по сравнению с комбинациями антитела против PD1 с исходным 18G10 или 18G10-G1. Не присутствовало значительной потери массы тела, ассоциированной с проведением монотерапии или комбинированной терапии, что указывает на то, что терапия являлась хорошо переносимой.

Пример 8. Эффект изотипа Fc на противоопухолевую активность антител против TIGIT в модели опухоли на животных.

Повторяли эксперимент, описанный в примере 7, за исключением того, что антитело крысы 18G10 заменяли на антитело крысы 11A11.

Мыши: самок мышей BALB/cAnN в возрасте приблизительно семь-восемь недель со средней массой тела 20 г получали из Taconic Laboratory (Germantown, NY). Общепринятый корм для животных и воду предоставляли без ограничений.

Реагенты-антитела:

антитело мыши против PD1 мыши - подтип IgG1;

антитело крысы против TIGIT мыши (11A11) - подтип IgG1 крысы. Это антитело описано на фигурах как исходное 11A11. Антитело 11A11 обладает последовательностью VH из SEQ ID NO: 138 и последовательностью VL из SEQ ID NO: 139;

химерное антитело крысы против TIGIT мыши (11A11), содержащее мышиную Fc-область подтипа mIgG1. Это антитело описано на фигурах как 11A11-G2a. (Изотип IgG1 мыши является мышиным изотипом, эквивалентным человеческому изотипу IgG4.);

химерное антитело крысы против TIGIT мыши 11A11, содержащее мышиную Fc-область подтипа mIgG2a. Это антитело описано на фигурах как 11A11-G2a. (Изотип IgG2a мыши является мышиным изотипом, эквивалентным человеческому изотипу IgG1.);

контрольное антитело для изотипа IgG1 мыши (совпадающее по изотипу IgG1 мыши контрольное моноклональное антитело, специфическое для аденовирусного гексона 25));

контрольное антитело для изотипа IgG1 крысы (совпадающее по изотипу IgG1 крысы контрольное моноклональное антитело, специфическое для IL-4 человека);

контрольное антитело для изотипа IgG2a мыши (совпадающее по изотипу IgG2a мыши контрольное моноклональное антитело, специфическое для аденовирусного гексона 25).

Составы реагентов-антител: составы являлись следующими:

mIgG1: 75 mM NaCl, 10 mM фосфат натрия, 3% сахароза, pH 7,4;

антитело против PD-1: 20 mM ацетат натрия, 9% сахароза, pH 5,5; mIgG2a: 75 mM NaCl, 10 mM фосфат натрия, 3% сахароза, pH 7,3;

IgG1 крысы: 20 mM ацетат натрия, 7% сахароза pH 5,5; 11A11: 20 mM NaAc, 100 mM NaCl, 3% сахара pH 5,5; 11A11-G1: 20 mM NaAc, 9% сахароза, pH 5,5; 11A11-G2a: 20 mM NaAc, 9% сахароза, pH 5,5.

Получение и имплантация линии клеток опухоли: клетки карциномы ободочной кишки CT26 культивировали в среде RPMI, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сывороткой. 3×10^5 находящихся в логарифмической фазе и субконфлюэнтных клеток CT26 инъецировали подкожно (п/к) в объеме 100 мкл бессывороточной RPMI в нижнюю заднюю часть правого бока каждой мыши. Мышей сначала выбривали с использованием электронной машинки в области, подлежащей использованию для имплантации.

CT-26 представляет собой линию клеток колоректальной аденокарциномы мыши, сингенной для линии мыши BALB/c. CT-26 является подходящей модельной системой для оценки механизма действия антитела против PD-1 является подходящей модельной системой для оценки механизма действия антитела против PD-1.

Измерения опухоли и массы тела: опухоли измеряли за сутки до первой дозы и дважды в неделю после. Длину и ширину опухоли измеряли с использованием электронного штангенциркуля и объем опухоли определяли с использованием формулы $\text{объем (мм}^3\text{)} = 0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$, где длина представляет собой более длинное измерение. Мышей периодически взвешивали для мониторинга общего состояния здоровья, а также для оценки фактической дозы доставки в мг/кг на мышью, при необходимости. Перед обработкой мышей взвешивали и измеряли опухоли индивидуальных мышей. Для предотвращения смещения любых выпадающих по массе или объему опухоли мышей удаляли и оставшихся мышей случайным образом распределяли по различным группам лечения с эквивалентным средним размером опухоли. Когда средний размер опухоли у несущих опухоль CT26 мышей достигал $\sim 100 \text{ мм}^3$, приблизительно через 7 суток после имплантации животных случайным образом распределяли по группам лечения по 10 мышей на группу и начинали дозирование. Животным проводили дозирование при концентрациях, указанных ниже.

Получение, введение и анализ растворов для дозирования: замороженные исходные растворы антител, подлежащих тестированию в модели на животных, размораживали и переносили во влажный лед. Чтобы исключить повторное замораживание и размораживание, каждый флакон исходного раствора размораживали один раз и разделяли на аликвоты в объемах, достаточных для однократного использования. Полипропиленовые пробирки с низкой адгезией использовали для этой цели. Аликвоты быстро замораживали в сухом льду и сохраняли при -80°C . Перед каждым дозированием, одну аликвоту размораживали и разводили до номинальной концентрации в подходящем разбавителе и проводили дозирование немедленно. Аликвоты растворов для дозирования быстро замораживали и хранили при -80°C до анализов. Растворы для дозирования оценивали с использованием платформы Meso Scale Discovery (MSD®, Rockville, MD), основанной на технологии множественных массивов; комбинации электрохемилюминесцентной детекции и структурированных массивов.

Результаты лечения с дозированием антител против TIGIT/против PD1: несущих опухоль CT26 мышей BALB/cAnN случайным образом распределяли на 10 групп лечения, когда средний объем опухоли этих мышей достигал среднего размера опухоли 100 мм^3 ($75\text{-}115 \text{ мм}^3$):

- (1) контроль для изотипа muIgG1+контроль для изотипа IgG1 крысы;
- (2) контроль для изотипа muIgG1+контроль для изотипа muIgG2a;
- (3) muDX400+контроль для изотипа IgG1 крысы;
- (4) muDX400+контроль для изотипа muIgG2a;
- (5) контроль для изотипа muIgG1+11A11;
- (6) контроль для изотипа muIgG+11A11-G1;
- (7) контроль для изотипа muIgG1 + 11A11-G2a;
- (8) muDX400 +11A11;
- (9) muDX400 + 11A11_G1;
- (10) muDX400 + 11A11_G2a.

Животным вводили антитела крысы против TIGIT мыши (11A11) или химерные антитела против TIGIT 11A11-G1 или 11A11-G2a (описанные выше) в дозе 20 мг/кг, IP, каждые 4 суток в течение каждого из 6 циклов. Антитела против PD-1 мыши (описанные выше) вводили в дозе 10 мг/кг, IP, каждые 4 суток

в течение каждого из 6 циклов. После дозирования животных продолжали мониторировать и объемы опухолей измеряли до 54 суток для некоторых групп лечения. Опухоли измеряли дважды в неделю. Результаты показаны на фиг. 12 и 13. Для монотерапии антителом против TIGIT с использованием 11A11-G2a показано 52% ингибирование роста опухоли (TGI) на сутки 14; в то время как от небольшой активности до отсутствия активности наблюдали с использованием исходного антитела 11A11 или антитела 11A11-G1. Для монотерапии антителом против PD1, 40-50% TGI наблюдали на сутки 14. Когда антитело против PD-1 комбинировали с контролем для изотипа крысы IgG1, показано 10% случаев полной регрессии (CR) на сутки 28, так что наблюдали 1 полный ответ из 10 животных. Для комбинации антитела против PD1 и исходного 11A11 показано 60% TGI на сутки 14 и показано 30% CR на сутки 54. Для комбинации антитела против PD1 и 11A11-G1 показано 56% TGI на сутки 14 и показано 30% CR на сутки 25. Для комбинации антитела против PD1 и 11A11-G2a показано 94% TGI на сутки 14 и показано 70% CR на сутки 42. Для комбинации антитела против PD1 и 11A11-G2a показаны большая противоопухолевая активность и более полная регрессия по сравнению с комбинациями антитела против PD1 с исходным 11A11 или 11A11-G1. Не присутствовало значительной потери массы тела, ассоциированной с проведением монотерапии или комбинированной терапии, что указывает на то, что терапия являлась хорошо переносимой.

Пример 9. Эпитопное картирование антитела против hTIGIT 14A6 посредством масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом.

Области контакта между антителом против TIGIT 14A6 и TIGIT человека определяли с использованием анализа масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS). HDX-MS измеряет обмен водорода на дейтерий в амидном остове белка. На скорость обмена влияет экспонирование водорода для растворителя. Сравнением уровней обмена в антигене, когда связано антитело, можно идентифицировать области белка, где связывается антитело.

Материалы.

TIGIT-His человека - содержащий внеклеточный домен hTIGIT (остатки 25-150 из SEQ ID NO: 31) и гистидиновую метку (SEQ ID NO: 87);

антитело крысы против hTIGIT 14A6 (содержащее последовательности VH/VL из SEQ ID NO: 7/8 (партия # 78AGU) и Fc-область IgG2a крысы) (mAb крысы × [TIGIT_H]) (LB155.14A6.G2.A8) IgG2a/каппа (HY)).

Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия.

Масс-спектрометр представлял собой Thermo Scientific Orbitrap-Velos. Для измерения меченных дейтерием образцов масс-спектрометр устанавливали для получения данных одного сканирования MS в полном диапазоне в орбитальной ионной ловушке при разрешающей способности 60000, количестве ионов-мишеней 1Е6, максимальном времени инъекции иона 500 мс и 2 микросканах. Для получения данных MS/MS для идентификации пептидов масс-спектрометр устанавливали для получения одного полного спектра сканирования при разрешающей способности 60000 с последующими десятью спектрами MS/MS в зависимости от данных в ионной ловушке.

Система жидкостной хроматографии представляла собой Waters® nanoACQUITY для градиента аналитической колонки и изократический насос Waters® 515 для расщепления и нанесения образца. Для расщепления и нанесения образца используемый буфер представлял собой 2% ацетонитрил и 0,05% трифторуксусную кислоту при скорости потока 80 мкл/мин. Для аналитического градиента буферы представляли собой буфер А) 0,1% муравьиная кислота в воде и буфер В) 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле.

Градиент пропускали при 40 мкл/мин от 2% В до 36% В за 10 мин с последующей промывкой 80% В в течение 2 мин и повторным уравниванием в 2% В в течение 3 мин. Затем колонку промывали посредством периодического пропуска градиента от 2 до 80% В, три раза по 1 мин на каждой стадии с последующим окончательным уравниванием 2% В в течение 5 мин. Улавливающая колонка представляла собой защитную колонку Waters® Vanguard C18 ВЕН 1,7 мкм, и аналитическая колонка представляла собой колонку Waters® C18 ВЕН300, 1,7 мкм 1×50 мм.

Манипуляции с образцом для мечения дейтерием выполняли посредством системы Leaptec H/D-X PAL. В планшете для мечения образцов устанавливали температуру 25°C, в планшете для остановки реакции устанавливали 1,5°C и в камере для ловушки и аналитической колонки устанавливали 1,5°C. Колонку с иммобилизованным пепсином (Porosyme Immobilized Pepsin 2,1×30 мм, Life Technologies) содержали вне камеры для колонок при комнатной температуре.

Мечение дейтерием.

hTIGIT-His (30 пмоль/мкл) смешивали с равным объемом антитела (14 пмоль/мкл) или, для контроля без связывания, с PBS pH 7,6. Связанные с антителом образцы и контроль без связывания инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч перед началом эксперимента мечения.

Для мечения образцов дейтерием 2 мкл образца смешивали с 25 мкл PBS в оксиде дейтерия pD 7,6. Временные точки мечения составляли 30, 300, 1500, 4500 или 9000 с. После установленного времени 25 мкл смеси для мечения добавляли к 35 мкл холодного буфера для остановки реакции (8М мочевины, 100

мМ ТСЕР). Образец после остановки реакции инкубировали при 1,5°C в течение одной минуты. Затем 55 мкл инъецировали в колонки в охлаждающей камере, где образец пропускали через колонку с пепсином, и полученные пептиды наносили на улавливающую колонку. Через три минуты переключением клапана колонку с пепсином отключали от линии и ловушку промывали дополнительно одну минуту. После этого ловушку подключали к линии с аналитической колонкой и подключали аналитический градиент и масс-спектрометр.

Полностью дейтерированный образец получали посредством инкубации 2 мкл hTIGIT с 108 мкл дейтерированного денатурирующего буфера (4М мочевины, 100 мМ ТСЕР, 0,01% DDM в 99,5% оксиде дейтерия). Образец инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Затем 55 мкл напрямую инъецировали в колонки в камере и данные получали, как ранее.

Анализ данных.

Данные LC-MS/MS получали для немеченого образца и исследовали до мечения дейтерием для верификации успешного расщепления белков и для получения списка пептидов после расщепления пепсином. Проводили поиск данных в базе данных с использованием Proteome Discoverer 1.4 и алгоритма поиска SEQUEST HT (ThermoFisher Scientific). Базу данных белков, используемую для последовательностей TIGIT человека-His и антител против hTIGIT, связывали с базой данных для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* uniprot (5/20/13).

Данные MS для экспериментов мечения дейтерием обрабатывали посредством HDExaminer (версии 1.3, Sierra Analytics). Массу и время удержания, выбранные посредством программного обеспечения для каждого пептида, верифицировали вручную.

Результаты.

Пептиды TIGIT человека, защищенные посредством связывания антитела 14A6, проиллюстрированы на тепловой карте из фиг. 14 и соответствуют аминокислотным остаткам 54-57, 68-70 и 76-81 из SEQ ID NO: 31. (Эти же аминокислоты показаны как остатки 30-33, 44-46 и 52-57 из SEQ ID NO: 87.)

Пример 10. Эпитопное картирование антитела против hTIGIT 31C6 посредством масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом.

Области контакта между антителом против TIGIT 31C6 и TIGIT человека определяли с использованием анализа масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS). HDX-MS измеряет обмен водорода на дейтерий в амидном остове белка. Одним из факторов, влияющих на скорость обмена, является экспонирование водорода для растворителя. Сравнением уровней обмена в антигене, когда связано антитело, можно идентифицировать области белка, где связывается антитело.

Материалы.

TIGIT-His человека - содержащий внеклеточный домен hTIGIT (остатки 25-145 из SEQ ID NO: 31) и гистидиновою метку (SEQ ID NO: 87).

Антитело мыши против anti-hTIGIT 31C6 (партия # 41АНК) (mAb мыши × [TIGIT_H] (MEB125.31C6.A1.205) IgG1/каппа (HY)).

Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия.

Масс-спектрометр представлял собой Thermo Scientific Orbitrap-Elite. Для измерения меченных дейтерием образцов, масс-спектрометр устанавливали для получения данных одного сканирования MS в полном диапазоне в орбитальной ионной ловушке при разрешающей способности 120000, количестве ионов-мишеней 1Е6, максимальном времени инъекции иона 500 мс и двух микросканах. Для получения данных MS/MS для идентификации пептидов масс-спектрометр устанавливали для получения одного полного спектра сканирования при разрешающей способности 120000 с последующими десятью спектрами MS/MS в зависимости от данных в ионной ловушке.

Система жидкостной хроматографии представляла собой Waters nanoAcquity для градиента аналитической колонки и изократический насос Waters 515 для расщепления и нанесения образца. Для расщепления и нанесения образца используемый буфер представлял собой 2% ацетонитрил и 0,05% трифторуксусную кислоту при скорости потока 80 мкл/мин. Для аналитического градиента, буферы представляли собой буфер А) 0,1% муравьиная кислота в воде и буфер В) 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле.

Градиент пропускали при 40 мкл/мин от 2% В до 36% В за 10 мин, с последующей промывкой 80% В течение 2 мин и повторным уравниванием в 2% В в течение 3 мин. Затем колонку промывали посредством периодического пропуска градиента от 2 до 80% В, три раза по 1 мин на каждой стадии с последующим окончательным уравниванием 2% В в течение 5 мин. Улавливающая колонка представляла собой защитную колонку Waters Vanguard CSH C18 1,7 мкм Guard Column, и аналитическая колонка представляла собой колонку Waters CSH C18, 1,7 мкм 1 × 50 мм.

Манипуляции с образцом для мечения дейтерием выполняли посредством системы Leptec H/D-X PAL. В планшете для мечения образцов устанавливали температуру 25°C, в планшете для остановки реакции устанавливали 1,5°C и в камере для ловушки и аналитической колонки устанавливали 1,5°C. Колонку с иммобилизованным пепсином (Enzymate ВЕН Pepsin, Waters corporation) содержали вне камеры для колонок при комнатной температуре.

Мечение дейтерием.

hTIGIT-His (63 пмоль/мкл) смешивали с равным объемом антитела (32 пмоль/мкл) или, для контроля без связывания, с PBS pH 7,6. Связанные с антителом образцы и контроль без связывания инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч перед началом эксперимента мечения.

Для мечения образцов дейтерием, 2 мкл образца смешивали с 25 мкл PBS в оксиде дейтерия pH 7,6. Временные точки мечения составляли 30, 300, 1500, 4500, 9000 и 13500 с. После установленного времени, 25 мкл смеси для мечения добавляли к 35 мкл холодного буфера для остановки реакции (8М мочевины, 100 мМ ТСЕР). Образец после остановки реакции инкубировали при 1,5°C в течение одной минуты. Затем 55 мкл инъецировали в колонки в охлаждающей камере, где образец пропускали через колонку с пепсином, и полученные пептиды наносили на улавливающую колонку. Через три минуты, переключением клапана колонку с пепсином отключали от линии, и ловушку промывали дополнительно одну минуту. После этого ловушку подключали к линии с аналитической колонкой, и подключали аналитический градиент, и начинали сбор масс-спектрометрических данных. Каждую временную точку получали в трех повторах в случайном порядке.

Полностью дейтерированный образец получали посредством инкубации 2 мкл hTIGIT (63 пмоль/мкл) с 108 мкл дейтерированного денатурирующего буфера (4М мочевины, 100 мМ ТСЕР, 0,01% DDM в 99,5% оксиде дейтерия). Образец инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Затем 55 мкл напрямую инъецировали в колонки в камере, и данные получали, как ранее.

Анализ данных.

Данные LC-MS/MS получали для немеченого образца и проводили поиск в базе данных для верификации успешного расщепления белков и для получения списка пептидов после расщепления пепсином. Проводили поиск данных в базе данных с использованием Proteome Discoverer 1.4 и алгоритма поиска SEQUEST HT (ThermoFisher Scientific). Базу данных белков, используемую для последовательностей TIGIT человека-His и антител против hTIGIT, связывали с базой данных для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* uniprot (5/20/13).

Данные MS для экспериментов мечения дейтерием обрабатывали посредством HDEaminer (версии 1.3, Sierra Analytics). Массу и время удержания, выбранные посредством программного обеспечения для каждого пептида, верифицировали вручную.

Результаты.

Пептиды TIGIT человека, защищенные посредством связывания антитела 31C6, проиллюстрированы на тепловой карте из фиг. 15 и соответствуют аминокислотным остаткам 53-57, 60-65, 68-70, 72-81, 94-95, 109-119 из SEQ ID NO: 31. (Эти же аминокислоты показаны как остатки 29-33, 36-41, 44-46, 48-57, 70-71, 85-95 из SEQ ID NO: 87.)

Пример 11. Анализ активности Т-клеток *in vitro* для гуманизированных антител против hTIGIT.

Авторы настоящего изобретения далее анализировали активность различных гуманизированных вариантов одного из антител по изобретению (31C6). В одном из анализов авторы настоящего изобретения характеризовали функциональные последствия блокирования рецептора TIGIT человека с использованием клеток hTIGIT-Jurkat. В этом анализе hTIGIT-Jurkat культивировали совместно с клетками JY, сконструированными для экспрессии CD155 человека (hCD155-JY). Используемая линия клеток JY представляет собой иммортализованную посредством вируса Эпштейна-Барр (EBV) лимфобластоидную линию В-клеток. Как в анализе, описанном выше в примере 3, когда клетки hTIGIT Jurkat стимулируют с использованием связанного с планшетом α -CD3 и культивируют совместно с исходными клетками JY (не экспрессирующими CD155 человека), они продуцируют IL-2. Однако когда hTIGIT-Jurkat культивировали совместно с hCD155-JY, уровни IL-2 уменьшались зависимым от лиганда образом. Обработка антителами против hTIGIT восстанавливает продукцию IL-2 в этом анализе зависимым от дозы образом.

В этом анализе 96-луночные плоскодонные планшеты покрывали антителом мыши против CD3 человека (1 мкг/мл в PBS; Clone HIT3a; BD Pharmingen Кат. № 555336) в течение ночи при 4°C. На следующие сутки экспрессирующие hTIGIT клетки Jurkat (50000) высевали в предварительно покрытые планшеты и проводили предварительную инкубацию в течение 30-60 мин с mAb в различных концентрациях. Экспрессирующие CD155 человека клетки JY (50000) добавляли в культуру. После инкубации в течение 18-24 ч при 37°C и 5,0% CO₂, уровни IL-2 в культуральных супернатантах оценивали посредством mesoscale (Набор Human IL-2 Tissue Culture MESO Набор: Кат. № K151АНВ-2). Результаты показаны на фиг. 16. При титровании исходного антитела мыши против hTIGIT клона 31C6 (MEB125.31C6.A1, 205 мIgG1) от 30 мкг/мл со снижением до 0,04 мкг/мл получили EC₅₀ 0,730 мкг/мл, и при таком же титровании химерного мышино-человеческого 31C6 (мышинное-человеческое химерное MEB125.31C6.A1.205 IgG1) получили EC₅₀ 0,910 мкг/мл.

(Мышиное-человеческое химерное 31C6 содержало переменные области исходного клона 31C6 (SEQ ID No: 94 и 95) и область IgG1 человека.) Подобным образом, при титровании гуманизированных вариантов 31C6 от 30 мкг/мл со снижением до 0,04 мкг/мл получили следующие EC₅₀:

Гуманизированный вариант	EC ₅₀
MEB125.31C6.A1,205 VH4/VL1 (Антитело, содержащее VH из SEQ ID NO: 127 и VL из SEQ ID NO:130, и Fc-область IgG1 человека)	0,620 мкг/мл
MEB125.31C6.A1,205 VH5/VL4 (Антитело, содержащее VH из SEQ ID NO: 128 и VL из SEQ ID NO:133, и Fc-область IgG1 человека)	1,2 мкг/мл
MEB125.31C6.A1,205 VH5/VL3 (Антитело, содержащее VH из SEQ ID NO: 128 и VL из SEQ ID NO:132, и Fc-область IgG1 человека)	1,2 мкг/мл

Авторы настоящего изобретения использовали также анализ на основе первичных клеток, чтобы продемонстрировать, что гуманизированные антитела против hTIGIT обладают активностью по отношению к первичным клеткам. Проводили скрининг нескольких партий мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека по экспрессии TIGIT после стимуляции (стимуляция в реакции смешанной культуры лимфоцитов и стимуляция α -CD3). Затем PBMC выбирали для анализов на основе первичных клеток на основании их экспрессии TIGIT после стимуляции. С использованием HuCD155-Fc покрывали планшеты для культивирования тканей и PBMC стимулировали с использованием антитела против CD3.

В этом анализе 96-луночные планшеты с высоким связыванием (Corning 3361) покрывали с использованием CD155-Fc человека (собственного производства, 1 мкг/мл in PBS) в течение ночи при 4°C. На следующие сутки 50000 PBMC человека (Precision Bioservice Кат. № 83000C-1,0, партия #12920 в RPMI+10% сыворотка человека Bio-world кат. № 30611043-1, партия # V15022401, RBC удаляли посредством BD Pharmlyse BD кат. № 555899), высевали в предварительно покрытые планшеты и проводили предварительную инкубацию в течение 30-60 мин с mAb против TIGIT в различных концентрациях. Затем добавляли антитело против CD3 (eBioscience 16-0037-85) в конечной концентрации 1 мкг/мл. После инкубации в течение 48 ч при 37°C и 5,0% CO₂, провоспалительные цитокины (IFN γ , IL1 β , IL6 и TNF α) оценивали в культуральных супернатантах посредством анализа mesoscale (Набор Human Proinflammatory-4 I tissue culture MESO: Кат. №K15009B-4). Как показано на фиг. 17, гуманизированные варианты 31C6 являлись способными стимулировать IL-6, TNF α и IFN γ зависимым от дозы образом, подобно мышинному-человеческому химерному антителу 31C6.

Подписи на фиг. 17 соответствуют следующим антителам:

мышинное-человеческое химерное MEB125.31C6.A1.205 IgG1 соответствует антителу, содержащему варибельные области исходного 31C6 клона (SEQ ID No: 94 и 95) и область IgG1 человека);

MEB125.31C6.A1.205 VH4/VL1 соответствует антителу, содержащему VH из SEQ ID NO: 127 и VL из SEQ ID NO: 130, и Fc-область IgG1 человека);

MEB125.31C6.A1.205 VH5/VL4 соответствует антителу, содержащему VH из SEQ ID NO: 128 и VL из SEQ ID NO: 133, и Fc-область IgG1 человека);

MEB125.31C6.A1.205 VH5/VL3 соответствует антителу, содержащему VH из SEQ ID NO: 128 и VL из SEQ ID NO: 133, и Fc-область IgG1 человека).

Содержание всех цитируемых в настоящем документе ссылок приведено в качестве ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что содержание каждой индивидуальной публикации, записи в базах данных (например, последовательностей в Genbank или записей GeneID), патентной заявки, или патента, приведено в качестве ссылки. Это утверждение о включении в качестве ссылки предназначено заявителями в соответствии с 37 C.F.R. 1.57(b)(1), чтобы относиться ко всем без исключения индивидуальным публикациям, записям в базах данных (например, последовательностям в Genbank или записям GeneID), патентным заявкам или патентам, каждая из которых явно указана в соответствии с 37 C.F.R. 1.57(b)(2), даже если такое цитирование не примыкает непосредственно к объявленному утверждению о включении в качестве ссылки. Включение объявленных утверждений о включении в качестве ссылки, если они присутствуют, в описание, никаким образом не ослабляет этого общего утверждения о включении в качестве ссылки. Цитирование ссылок в настоящем документе как не предназначено в качестве признания того, что ссылка относится к предшествующему уровню техники, так и не составляет какого-либо признания относительно содержания или даты этих публикаций или документов.

Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе, будут очевидны специалистам в данной области из указанного выше описания и сопутствующих фигур. Такие модификации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

Указанное выше письменное описание считают достаточным, чтобы позволять специалисту в дан-

ной области для практического осуществления изобретения. Различные модификации изобретения в дополнение к показанным и описанным в настоящем документе будут очевидны специалистам в данной области из указанного выше описания и включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

Таблица 4. Информация о последовательности

Описание	SEQ ID NO:	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
14A6 H - CDR1	1	SDYWG
14A6 H - CDR2	2	FITYSGSTSYNPSLKS
14A6 H - CDR3	3	MPSFITLASLSTWEGYFDF
14A6 L - CDR1	4	KASQSIHKNLA
14A6 L - CDR2	5	YANSLQT
14A6 L - CDR3	6	QYYSGWT
14A6 ИСХОДНАЯ VH	7	EVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGSSIASDYWGIRKFPGNKMEW MGFITYSGSTSYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQLHSVTDDTATYS CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWGPQGMVTVSS
14A6 ИСХОДНАЯ VL	8	DIQMTQSPSLLASASVGDVRLNCKASQSIHKNLAWYQQKLGEPKFL IYYANSLQGTGIPSRFSGSGSGTDFTLTIISGLQPEDVATYFCQQYYSG WTFGGGTKVELK
Hu14A6VH.1	9	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWGIRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWQQGMVTVSS
Hu14A6VH.1a	10	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWGIRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWQQGMVTVSS
Hu14A6VH.1b	11	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWGIRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWQQGMVTVSS
Hu14A6VH.1c	12	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWGIRQPPGKGLEW MGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWQQGMVTVSS
Hu14A6VH.1d	13	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWGIRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWQQGMVTVSS
Hu14A6VH.1e	14	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWGIRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWQQGMVTVSS
Hu14A6VH.1f	15	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWGIRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY

		CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.1g	16	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGSSISSDYWGWRQPPGKGLEW MGFITYSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2	17	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWGWRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2a	18	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWGWRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2b	19	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWGWRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2c	20	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGSSISSDYWGWRQPPGKGLEW MGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2d	21	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWGWRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2e	22	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWGWRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2f	23	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGSSISSDYWGWRQPPGKGLEW IGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6VH.2e	24	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGSSISSDYWGWRQPPGKGLEW MGFITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSEFITLASLSTWEGYDFEWGQGMVTVSS
Hu14A6Vk.1	25	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPKAPKLL IYYANSLQIGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
Hu14A6Vk.1a	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPKAPKFL IYYANSLQIGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
Hu14A6Vk.1b	27	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPKAPKFL IYYANSLQIGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
Hu14A6Vk.2	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPKVPKLL IYYANSLQIGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
Hu14A6Vk.2a	29	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPKVPKFL IYYANSLQIGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
Hu14A6Vk.2b	30	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPKVPKFL IYYANSLQIGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
TIGIT	31	mrwclliwa qglrqaplas gmmgtgiett gnisaekggs

человека		iilqchlsst taqvtqvnwe qdqqla <u>icn</u> adlgwhisps fkdrvappgp lgltlqsltv ndtgeyfcy htypdgtytg riflevless vaehgarfqi pllgamaatl vvictavivv valtrkkkal rihsvegdlr rksagqeews psapsppgsc vgaeaapagl cgeqrgeedca elhdyfnvls yrslgnscsf tetg
TIGIT яванского макака/макака -резуса	32	mrwclfliwa qglrqaplas gmmgtgiett gnisakkgs vilqchlsst maqvtqvnwe qhdhslair naelgwhiyp afkdrvappgp glgtlqslt mndtgeyfcy yhtypdgyr griflevles svaehsarfq ipllgamamm lvviciaviv vvvlarkkks lrihsvesgl qrkstgqeeq ipsapsppgs cvgaeaapag lcgeqqgddc aelhdyfnvl syrslgscsf ftetg
Тяжелая цепь пембролизумаб а	33	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYMYWVRQAPGGLEW MGGINPNSGGTTFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVY YCARRDYRFDMGFQYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVKDRVESKYGPCCPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTI SKAQGPPEPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK
Легкая цепь пембролизумаб а	34	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPKGQA PRLLIYLASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDEFAVYYCQH SRDLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Тяжелая цепь ниволумаба	35	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKLEW VAVIWYDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVY YCATNDDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVKDRVESKYGPCCPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAQGPPEPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME ALHNHYTQKLSLSLGLK
Легкая цепь ниволумаба	36	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLI IYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDEFAVYYCQSSNW PRTEFGQGTQVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16АНА_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH1 LB155.14A6.G2 .A8_VH1	37	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSSIADSYWGWRQPPGKLEW IGFITYSGSTSYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWGGQTMVTSSAS
18АНА_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH2 LB155.14A6.G2 .A8_VH2	38	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSSIADSYWGWRQPPGKLEW IGFITYSGSTSYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWGGQTMVTSS
20АНА_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH3 LB155.14A6.G2 .A8_VH3	39	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSSIADSYWGWRQPPGKLEW IGFITYSGSTSYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARMPSFITLASLSTWEGYFDFWGGQTMVTSS
21АНА_tigit_1	40	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSSIADSYWGWRQPPGKLEW

4а6_гуманизир ованная_VH4 LB155.14A6.G2 .A8_VH4		IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISRDT S KNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
19AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH5 LB155.14A6.G2 .A8_VH5	41	EVQLQESGPGLVK P SETLSLTCTVSGSSIADYWG W IRQPPGKMEW IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISRDT S KNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
22AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH6 LB155.14A6.G2 .A8_VH6	42	EVQLQESGPGLVK P SETLSLTCTVSGSSIADYWG W IRKPPGKMEW IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISRDT S KNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
23AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH7 LB155.14A6.G2 .A8_VH7	43	EVQLQESGPGLVK P SETLSLTCTVSGSSIADYWG W IRQPPGKGLEW IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISRDT S KNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
24AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH8 LB155.14A6.G2 .A8_VH8	44	EVQLQESGPGLVK P SETLSLTCTVSGSSIADYWG W IRKPPGKMEW IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISVDTSKNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
25AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH9 LB155.14A6.G2 .A8_VH9	45	EVQLQESGPGLVK P SETLSLTCSVTGSSIADYWG W IRQPPGKGLEW IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISRDT S KNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
26AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH10 LB155.14A6.G2 .A8_VH10	46	EVQLQESGAGLLK P SETLSLTCSVTGSSIADYWG W IRQPPGKGLEW IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISVDTSKNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
27AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованная_VH11 LB155.14A6.G2 .A8_VH11	47	EVQLQESGPGLVK P PGTSLTCSVTGSSIADYWG W VRQPPGKGLEW IGFIT Y SGSTSYNPSL K SRVTISVDTSKNQFSL K LSSVTAADTAVYY CARMPSFITL A SLSTWEGYFDFEWGQGTMTVSS
09AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованное_VL1 LB155.14A6.G2 .A8_VL1	48	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKLL IYYANSLQ T GVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS S LQPEDFATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
11AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованное_VL2 LB155.14A6.G2 .A8_VL2	49	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKFL IYYANSLQ T GVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS S LQPEDFATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
12AHA_tigit_1 4а6_гуманизир ованное_VL3 LB155.14A6.G2 .A8_VL3	50	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKLL IYYANSLQ T GVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS S LQPEDFATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK

13АНА_tigit_1 4a6 гуманизир ованное_VL4 LB155.14A6.G2 .A8_VL4	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKFL IYYANSLQQTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYFCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
15АНА_tigit_1 4a6 гуманизир ованное_VL5 LB155.14A6.G2 .A8_VL5	52	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKLL IYYANSLQQTGLPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYYSG WTFGGGTKVEIK
Лидерная последователь ность тяжелых цепей	53	MEWSWVFLFFLSVTTGVHS
Лидерная последователь ность легких цепей	54	MSVPTQVLGLLLLWLTDAFC
Константный домен тяжелой цепи - IgG4, S228P	55	TKGQSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQKTYTCNVDPKPKSNTKVDK RVESKYGGPPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
Константный домен легкой цепи каппа	56	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
28H5 H - CDR1	57	GYSITSDYAWN
28H5 H - CDR2	58	YISNNGSASYNPFLKS
28H5 H - CDR3	59	LIYYDYGGAMNF
28H5 L - CDR1	60	KASQGVSTTVA
28H5 L - CDR2	61	SASYRYT
28H5 L - CDR3	62	QHYYSTPWT
28H5 ИСХОДНАЯ VH	63	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPNGKLE WMGYISNNGSASYNPFLKSRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATY YCATLIYYDYGGAMNFWGQTSVTVSS
28H5 ИСХОДНАЯ VL	64	DIVMTQSHKFMSTSVGDRTITCKASQGVSTTVAWYQQKPGQSPKLL IYSASYRYTGVDRFTGSGSGTDFTFTISSVQSEDLAVYYCQHYYST PWTFGGGTKLEIK
14H6 L - вариант CDR2	65	YASNLQT
14H6 L - вариант CDR2	65	YASSLQT
14H6 L - вариант CDR2	67	YASTLQT
14H6 L - вариант CDR2	68	YATTLQT
14H6 L - вариант CDR2	69	YASYLQT
14H6 L - вариант CDR2	70	YANQLQT
14H6 L - вариант CDR2	71	YAGSLQT
14H6 L - вариант CDR2	72	YASQLQT
14H6 L - вариант CDR2	73	YADSLQT
14H6 L -	74	QQYYSGFT

вариант CDR3		
14H6 L - вариант CDR3	75	QQYYSGYT
14H6 L - вариант CDR3	76	QQYYSGIT
14H6 L - вариант CDR3	77	QQYYSGVT
14H6 L - вариант CDR3	78	QQYYSGLT
14H6 H - вариант CDR3	79	MPSFITLASLSTFEGYFDF
14H6 H - вариант CDR3	80	MPSFITLASLSTYEGYFDF
14H6 H - вариант CDR3	81	MPSFITLASLSTIEGYFDF
14H6 H - вариант CDR3	82	MPSFITLASLSTVEGYFDF
14H6 H - вариант CDR3	83	MPSFITLASLSTLEGYFDF
Нуклеиновая кислота, кодирующая исходную VH 28H5	84	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAACCTTCTCA GTCTCTGTCCCTCACCTGCACCTGTCCTGGCTACTCAATCACCAGTG ATTATGCCTGGAACCTGGATCCGACAGTTCCAGGAAACAAACTGGAG TGGATGGGCTACATAAGCAACAGTGGTAGCGCTAGCTACAACCCATC TCTCAAAGTCGCATCTCTACTCGAGACACATCCAAGAACCAGT TCTTCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAT TACTGTGCAACCTGATCTACTATGATTACGGGGGGCTATGAACTT CTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCCTCTCCTCA
Нуклеиновая кислота, кодирующая исходную VL 28H5	85	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCAGTAGG AGACAGGGTACAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGGTGTGAGTACTA CTGTGGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTG ATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTAC TGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGC AGTCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCATTATTATAGTACT CCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAATCAAA
Константный домен тяжелой цепи - IgG1	86	ASTKGFPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLTP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHQKLSLSLSPG K
hTIGIT-HIS	87	gtiett gnisaekggs iilqchlsst taqvtqvnwe qqdqlaich adlgwhisps fkdrvapppg lgltlqsltv ndtgeyfcy htypdgtytg rifleless vaehgarfqi pllga hhhhhhhhhggq
31C6 H -CDR1	88	SYVMH
31C6 H -CDR2	89	YIDPYNDGAKYNEKFKG
31C6 H -CDR3	90	GGPYGWYFDV
31C6 L - CDR1	91	RASEHIYSYLS
31C6 L - CDR2	92	NAKTLAE
31C6 L - CDR3	93	QHHEGSPLT
31C6 ИСХОДНАЯ VH (с подчеркнутыми CDR)	94	EVQLQQSGPELVKPGSSVKMSCKASGYTFSSYVMHWKQKPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVY YCARGGPYGWYFDVWGAGTTVTVSS
31C6 ИСХОДНАЯ VL (с подчеркнутыми CDR)	95	DIQMTQSPASLSASVGETVTTTCRASEHIYSYLSWYQQKQKSPQLL VYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYTCQHHEGSP PLTFGAGTTLELK

31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (D56R)	96	YIDPYNrgAKYNEKFG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (D56L)	97	YIDPYNlgAKYNEKGF
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (D56K)	98	YIDPYNkgAKYNEKFG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (D56F)	99	YIDPYNfgAKYNEKFG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (D56S)	100	YIDPYNsgAKYNEKFG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (D56Y)	101	YIDPYNygAKYNEKFG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (D56V)	102	YIDPYNvgAKYNEKFG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57R)	103	YIDPYNdrAKYNEKFKG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57N)	104	YIDPYNDnAKYNEKFKG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57Q)	105	YIDPYNDqAKYNEKFKG
31C6 H ВАРИАНТ CDR2 (G57E)	106	YIDPYNdeAKYNEKFKG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57 л)	107	YIDPYNDlAKYNEKFKG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57K)	108	YIDPYNDkAKYNEKFKG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57S)	109	YIDPYNdsAKYNEKFKG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57Y)	110	YIDPYNDyAKYNEKFKG
31C6 H - ВАРИАНТ CDR2 (G57V)	111	YIDPYNDvAKYNEKFKG
31C6 L - вариант CDR2 (N50A)	112	AAKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (N50Y)	113	YAKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (N50W)	114	WAKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (N50S)	115	SAKTLAE
31C6 L - вариант CDR2	116	TAKTLAE

(N50T)		
31C6 L - вариант CDR2 (N50I)	117	IAKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (N50V)	118	VAKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (A51N)	119	NNKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (A51I)	120	NIKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (A51L)	121	NLLTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (A51T)	122	NTKTLAE
31C6 L - вариант CDR2 (A51V)	123	NVKTAE
31C6_HUMZ_VH1 (с подчеркнутыми CDR)	124	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYSQKFQGRVTLTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS
31C6_HUMZ_VH2 (с подчеркнутыми CDR)	125	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYSQKFQGRVTLTSDKASTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS
31C6_HUMZ_VH3 (с подчеркнутыми CDR)	126	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVY YCARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS
31C6_HUMZ_VH4 (с подчеркнутыми CDR)	127	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTSDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVY YCARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS
31C6_HUMZ_VH5 (с подчеркнутыми CDR)	128	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS
31C6_HUMZ_VH6 (с подчеркнутыми CDR)	129	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTSDKSI STAYMELSSLRSDDTVVY YCARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS
31C6_Humz_L1 (с подчеркнутыми CDR)	130	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEHIYSYLSWYQQKPKGKAPKLL IYNAKTLAEGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFFGS PLTFGQGTREIK
31C6_Humz_L2 (с подчеркнутыми CDR)	131	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEHIYSYLSWYQQKPKGKAPKLL IYNAKTLAEGVPSRFRSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCQHFFGS PLTFGQGTREIK
31C6_Humz_L3 (с подчеркнутыми CDR)	132	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEHIYSYLSWYQQKPKGKVPKLL IYNAKTLAEGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHFFGS PLTFGQGTREIK
31C6_Humz_L4 (с подчеркнутыми CDR)	133	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEHIYSYLSWYQQKPKGKVPKLL IYNAKTLAEGVPSRFRSGSGSGTQFTLTISLQPEDVATYYCQHFFGS PLTFGQGTREIK

31С6 Н - вариант CDR2	134	YIDPYNDGAKYAQKFQG
31С6 Н - вариант CDR2	135	YIDPYNDGAKYSQKFQG
18G10 - последователь ность VH	136	QVQLMESGPGVLVQPSQTL ^{SLT} CTVSGFPLTSYTVHWVRQPPGKGLEW IGAIWSSGSTDYNSALKSR ^{LN} INRDSSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYF CTKSGWAFFDYWGQGVMTVSS
18G10 - последователь ность VL	137	DIQMTQSPSLLSASVGD ^{RVT} LNLCIASQNIYKSLAWYQLKLG ^{EAP} KLL IYNANSLQAGIPSRFSGSGSGTDFAL ^{TIS} GLQPEDVATYFCQQYSGG YTFGAGTKLELK
11A11 - последователь ность VH	138	EVQLVESGGDLVQPG ^{RS} LKISCVASGFTFSDYYMAWVRLAPQKGLEW VASISYEGSRTHYGDSV ^{RGR} FIISRDNPKNILYLQMN ^{SL} GS ^{ED} TATY FCARHTGTLDWL ^{VY} WGQGT ^{LV} IVSS
11A11 - последователь ность VL	139	NIVMAQSPKMSISAG ^{DRVT} MNCKASQNV ^{DN} NI ^{AWY} QQKPGQSPKLL IFYASNRYSGV ^{DR} FTGGGYGTDF ^{TL} TIKSVQAEDAAFY ^{QC} RIY ^{NF} PTFGSGTKLEIK
14A6 Н - КОНСЕНСУС CDR3	140	MPSFITLASLSTX ^E GYDFD X=W, F, Y, I, V, L
14A6 L - КОНСЕНСУС CDR2	141	YAX ₁ X ₂ LQT X ₁ =N, S, T, G, D X ₂ =S, N, S, T, Y, Q
14A6 L - КОНСЕНСУС CDR3	142	QQYYSGXT X=W, F, Y, I, V, L
14A6 КОНСЕНСУСНАЯ ИСХОДНАЯ VH	143	EVQLQX ₁ SGX ₂ GLX ₃ KPX ₄ X ₅ X ₆ LSLTCX ₇ VX ₈ GX ₂₀ SIX ₃₁ SDYWG ^{WX} 9RX ₁₀ X ₁₁ PGX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ EWX ₁₅ GFITYSGSTSYNPSLKSFX ₁₆ X ₁₇ IX ₁₈ X ₁₉ DTSKNQFX ₂₀ LX ₂₁ LX ₂₂ SVT X ₂₃ X ₂₄ DTAX ₂₅ Y X ₂₆ CARMPSEFITLASLSTX ₂₇ EGYDFEFGX ₃₂ GTX ₂₈ X ₂₉ TVSS X ₁ =E или Q X ₂ =P или A X ₃ =V или L X ₄ =S или P X ₅ =Q или E или G X ₆ =S или T X ₇ =S или T или A X ₈ =T или S X ₉ =I или V X ₁₀ =K или Q X ₁₁ =F или P X ₁₂ =N или K X ₁₃ =K или G X ₁₄ =M или L X ₁₅ =M или I X ₁₆ =I или V X ₁₇ =S или T X ₁₈ =T или S X ₁₉ =R или V X ₂₀ =F или S X ₂₁ =Q или K X ₂₂ =H или S X ₂₃ =T или A X ₂₄ =D или A X ₂₅ =T или V X ₂₆ =S или Y, X ₂₇ =W, F, Y, I, V или L X ₂₈ =M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W или Y X ₂₉ =V, T или L X ₃₀ =S или G или Y X ₃₁ =A или S

		X ₃₁ =P или Q
14A6 КОНСЕНСУСНАЯ ГУМАНИЗИРОВАН НАЯ VH	144	EVQLQX ₁ SGX ₂ GLX ₃ KPX ₄ X ₅ TL ₆ SLTCX ₆ VX ₇ GX ₈ SIX ₉ SDYWGWX ₁₀ RX ₁₁ X ₁₂ PGKX ₁₃ X ₁₄ EWX ₁₅ GFITYSGSTSYNPSLKSFX ₁₆ TISX ₁₇ DTSKNQFSLKX ₁₈ SVTAX ₁₉ DT AVYYCARMPSFITLASLSTX ₂₀ EGYFDFWGGQTX ₂₁ X ₂₂ TVSS X ₁ =E или Q X ₂ =P или A X ₃ =V или L X ₄ =S или P X ₅ =E или G X ₆ =T или A или S X ₇ =S или T X ₈ =G или S или Y X ₉ =S или A X ₁₀ =I или V X ₁₁ =Q или K X ₁₂ =P или F X ₁₃ =G или K X ₁₄ =L или M X ₁₅ =I или M X ₁₆ =V или I X ₁₇ =V или R X ₁₈ =S или H X ₁₉ =A или D X ₂₀ =W, F, Y, I, V, L X ₂₁ =M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W или Y X ₂₂ =V, T или L
14A6 КОНСЕНСУСНАЯ ИСХОДНАЯ VL	145	DIQMTQSPSX ₁ LSASVGDVTVX ₂ X ₃ CKASQSIHKNLAWYQQKX ₄ GX ₅ X ₁₅ PKX ₆ LIIYYAX ₇ X ₈ LQTX ₉ PSRFSGSGSGTDFTLTISX ₁₀ LQPE DX ₁₁ ATYX ₁₂ CQQYYSGX ₁₃ TFGGGTKVEX ₁₄ K X ₁ =L или S X ₂ =L или I X ₃ =N или T X ₄ =L или P X ₅ =E или K X ₆ =F или L X ₇ =N, S, T, G или D X ₈ =S, N, T, Y или Q X ₉ =I или V X ₁₀ =G или S X ₁₁ =V или F X ₁₂ =F или Y X ₁₃ =W, F, Y, I, V или L X ₁₄ =L или I X ₁₅ =A или V
14A6 КОНСЕНСУСНАЯ ГУМАНИЗИРОВАН НАЯ VL	146	DIQMTQSPSSLSASVGDVTVITCKASQSIHKNLAWYQQKPKX ₆ PKX ₁ LIYYAX ₂ X ₃ LQTX ₄ PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDX ₇ ATYYCQQ YYSGX ₅ TFGGGTKVEIK X ₁ =L или F X ₂ =N, S, T, G или D X ₃ =S, N, T, Y или Q X ₄ =V или I X ₅ =W, F, Y, I, V или L X ₆ =A или V X ₇ =F или V
31C6 H - КОНСЕНСУС CDR2	147	YIDRYNX ₁ X ₂ AKYX ₃ X ₄ KFX ₅ G X ₁ =D, R, L, K, F, S, Y или V X ₂ =G, R, N, Q, E, L K, S, Y или V X ₃ =N, A или S X ₄ =E или Q X ₅ =K или Q
31C6 L - КОНСЕНСУС	148	X ₁ X ₂ KTLAE X ₁ =N, A, V, W, S, T, R, H G, I или V

CDR2 31C6 КОНСЕНСУСНАЯ ИСХОДНАЯ VH	149	X ₂ =A, N, I, L, T или V EVQLX ₁ QSGX ₂ EX ₃ X ₄ KPGX ₅ SVKX ₆ SCKASGYTFSSYVMHWVX ₇ QX ₈ PG QX ₉ LEWIGYIDFPYN X ₁₀ X ₁₁ AKYX ₁₂ X ₁₃ KFX ₁₄ GX ₁₅ X ₁₆ TLTX ₁₇ DX ₁₈ SX ₁₉ STX ₂₀ YMELSX ₂₁ LX ₂₂ SX ₂₃ DX ₂₄ X ₂₅ VYYCAR GGPYGX ₂₆ YFDVWGX ₂₇ GTT ₂₈ TVTSS X ₁ =Q или V X ₂ =P или A X ₃ =V или L X ₄ =V или K X ₅ =S или A X ₆ =M или V X ₇ =K или R X ₈ =K или A X ₉ =G или R X ₁₀ =D, R, L, K, F, S, Y или V X ₁₁ =G, R, N, Q, E, L K, S, Y или V X ₁₂ =N, A или S X ₁₃ =E или Q X ₁₄ =K или Q X ₁₅ =R или K X ₁₆ =A или V X ₁₇ =S или R X ₁₈ =K или T X ₁₉ =S, I, A или T X ₂₀ =A или V X ₂₁ =R или S X ₂₂ =T или R X ₂₃ =D или E X ₂₄ =S или T X ₂₅ =A или V X ₂₆ =W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V или Y X ₂₇ =A или Q
31C6 КОНСЕНСУСНАЯ ГУМАНИЗИРОВАН НАЯ VH	150	EVQLVQSGAEVKKPGX ₁ SVKVSCKASGYTFSSYVMHWVWRQAPGQX ₂ LE WIG YIDFPYNX ₃ X ₄ AKYX ₅ X ₆ KFX ₇ GRVTLTX ₈ DX ₉ SX ₁₀ STX ₁₁ YMELSX ₁₂ LRSX ₁₃ DT X ₁₄ VYYCARGGPYGX ₁₅ YFDVWVGQGT ₁₆ TVTSS X ₁ =A или S X ₂ =R или G X ₃ =D, R, L, K, F, S, Y или V X ₄ =G, R, N, Q, E, L K, S, Y или V X ₅ =N, A или S X ₆ =E или Q X ₇ =K или Q X ₈ =R или S X ₉ =T или K X ₁₀ =A, T или I X ₁₁ =A или V X ₁₂ =S или R X ₁₃ =E или D X ₁₄ =A или V X ₁₅ =W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V или Y
31C6 КОНСЕНСУСНАЯ ИСХОДНАЯ VL	151	DIQMTQSPX ₁ SLSASVVGX ₂ X ₃ VTITCRASEHIYSYLSWYQQKX ₄ GKX ₅ PX ₆ LLX ₇ YX ₈ X ₉ KT ₁₀ LAEGVPSRFSGSGSGTX ₁₀ FX ₁₁ LX ₁₂ IX ₁₃ SLQ PEDX ₁₄ X ₁₅ TYYCQH ₁₆ HFGSPLT ₁₇ FGX ₁₆ GTX ₁₇ LEX ₁₈ K X ₁ =A или S X ₂ =E или D X ₃ =T или R X ₄ =Q или P X ₅ =S, A или V X ₆ =Q или K X ₇ =V или I

		X ₈ =N, A, Y, W, S, T, I или V X ₉ =A, N, I, L, T или V X ₁₀ =Q или D X ₁₁ =S или T X ₁₂ =K или T X ₁₃ =N или S X ₁₄ =F или V X ₁₅ =G или A X ₁₆ =A или Q X ₁₇ =T или R X ₁₈ =L или I
31C6 L - КОНСЕНСУСНАЯ ГУМАНИЗИРОВАН НАЯ VL	152	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEHIYSYLSWYQQKPKL LITY X ₂ X ₃ KTLEAGVPSRFSGSGSGTX ₄ FTLTISLQPEDX ₅ ATYYCQHHFG SPRTFGQGTREIK X ₁ =A или V X ₂ =N, A, W, W, S, T, I или V X ₃ =A, N, I, L, T или V X ₄ =D или Q X ₅ =F или V
31C6 H - КОНСЕНСУС CDR3	153	GGPYGXDFDV X ₁₅ =W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V или Y
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	154	GGPYGAYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	155	GGPYGDYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	156	GGPYGEYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	157	GGPYGFYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	158	GGPYGGYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	159	GGPYGIYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	160	GGPYGKYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	161	GGPYGNYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	162	GGPYGQYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	163	GGPYGRYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	164	GGPYGSYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	165	GGPYGTYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	166	GGPYGVYFDV
31C6 H - ВАРИАНТ CDR3	167	GGPYGYFDV

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с TIGIT человека (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), где
антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи,
где переменная область тяжелой цепи содержит
CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88,
CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, 134 или 135, и
CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и
где переменная область легкой цепи содержит
CDR1 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91,
CDR2 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и
CDR3 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 93.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит

CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88,

CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и

CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и

где переменная область легкой цепи содержит

CDR1 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91,

CDR2 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и

CDR3 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95;

b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132;

c) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; и

d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133;

e) переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 128, и

переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 132,

где любые вариации в последовательности происходят в каркасных областях антитела;

f) переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 127, и

переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130,

где любые вариации в последовательности происходят в каркасных областях антитела;

g) переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 128, и

переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична по аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133,

где любые вариации в последовательности происходят в каркасных областях антитела.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, которое представляет собой антитело.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, которое представляет собой антитело, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, которое представляет собой антитело, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, которое представляет собой антитело, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127 и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где антитело связывается с TIGIT человека со значением KD, равным примерно от 1×10^{-9} до 1×10^{-12} М, как определено с помощью

поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или аналогичной методикой (например, KinExa OCTET).

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов выше, которое представляет собой гуманизованное антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов выше, которое представляет собой гуманизованное антитело, где антитело содержит константный домен IgG1 человека и константный домен каппа человека.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, где тяжелые цепи содержат:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128; и

(ii) константный домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 86, и

где легкие цепи содержат:

(i) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 132; и

(ii) константный домен каппа человека, содержащий SEQ ID NO: 56.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, где тяжелые цепи содержат:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128; и

(ii) константный домен IgG4, содержащий SEQ ID NO: 55, и

где легкие цепи содержат:

(i) переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 132; и

(ii) константный домен каппа человека, содержащий SEQ ID NO: 56.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп.1-12.

14. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.13.

15. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по пп.1-12, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по п.13 или вектор экспрессии по п.14.

16. Композиция для повышения активации иммунных клеток или лечения злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

17. Композиция по п.16, дополнительно содержащая средство, выбранное из группы, состоящей из:

a) анти-PD1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

b) анти-LAG3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

c) анти-VISTA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

d) анти-BTLA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

e) анти-TIM3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

f) анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

g) анти-HVEM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

h) анти-CD27 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

i) анти-CD137 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

j) анти-OX40 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

k) анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

l) анти-PDL1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

m) анти-PDL2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

n) анти-GITR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

o) анти-ICOS антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

p) анти-SIRP α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

q) анти-ILT2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

r) анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

s) анти-ILT4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

t) анти-ILT5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

18. Композиция по п.17, в которой анти-PD1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и ниволумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

19. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

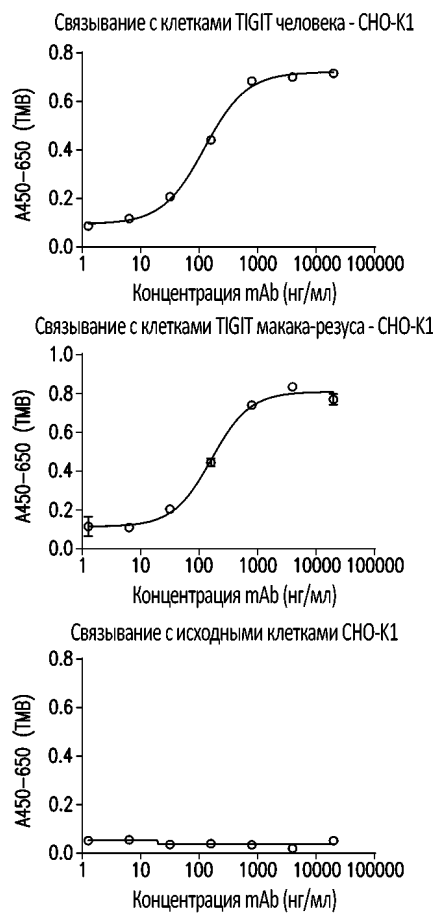
a) культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по пп.1-12 в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида; и

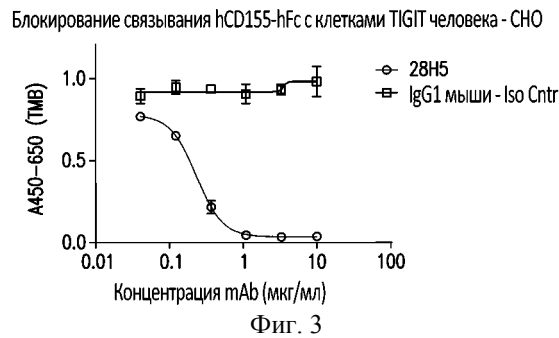
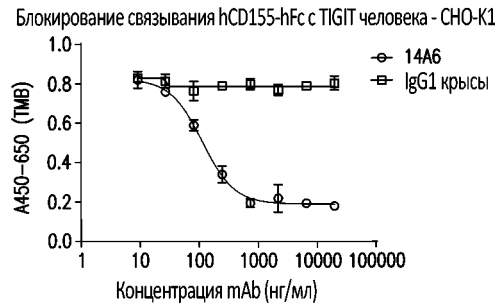
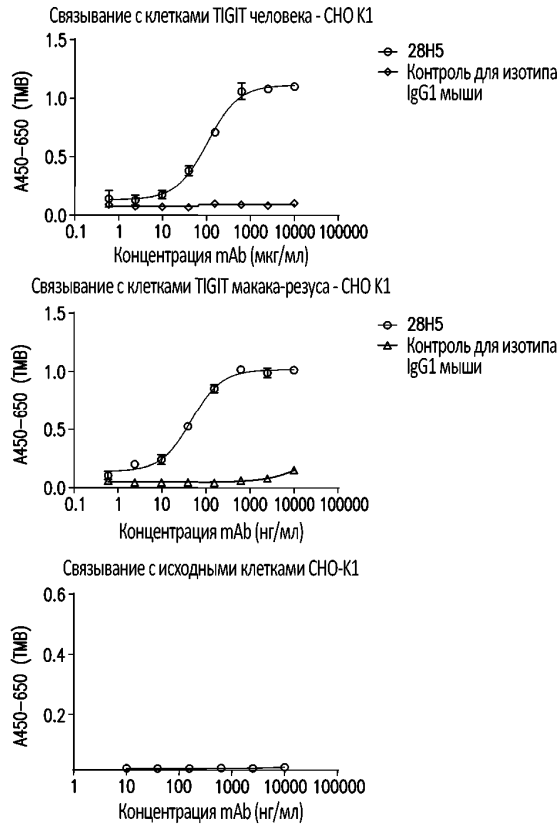
b) восстановление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина или культуральной среды.

20. Способ лечения злокачественной опухоли, инфекционного заболевания у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12.

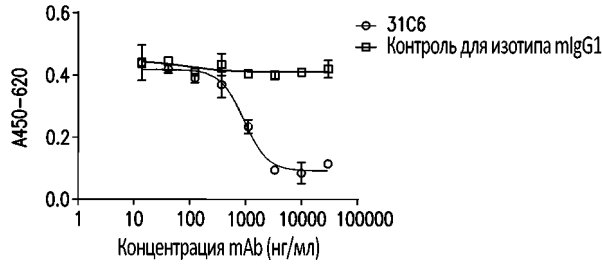
21. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для получения лекарственного средства:

- а) для увеличения активации иммунных клеток;
- б) для лечения злокачественной опухоли; или
- с) для лечения инфекционного заболевания.

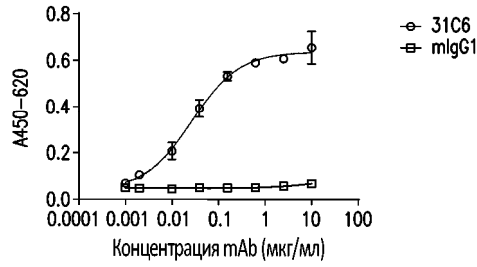




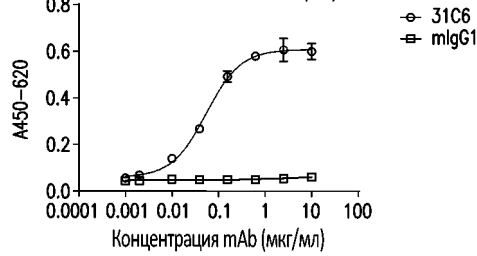
Блокирование связывания hCD155-hFc с TIGIT человека - CHO-K1



Связывание с hTIGIT-CHO

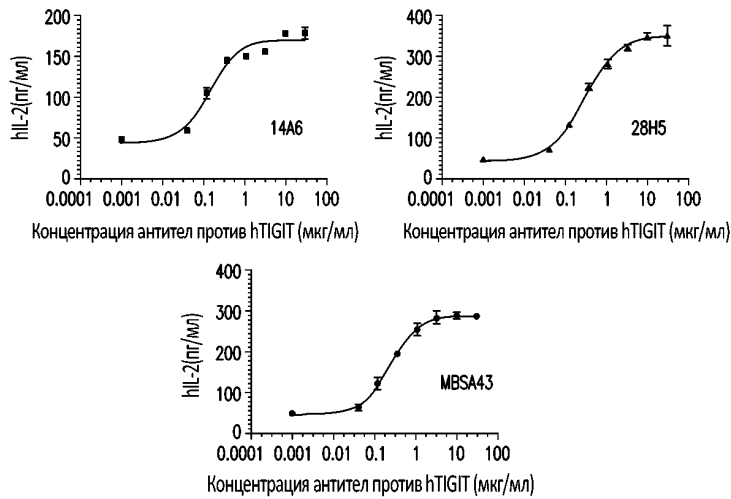


Связывание с TIGIT макака-резуса - CHO



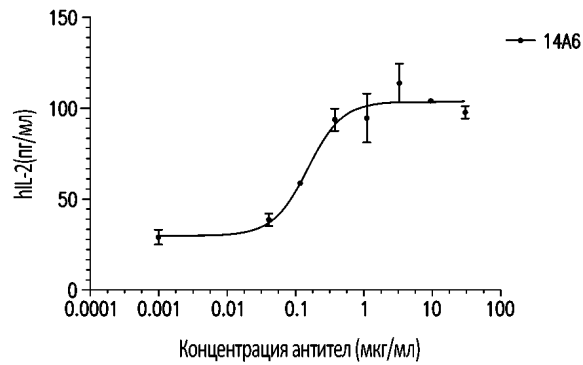
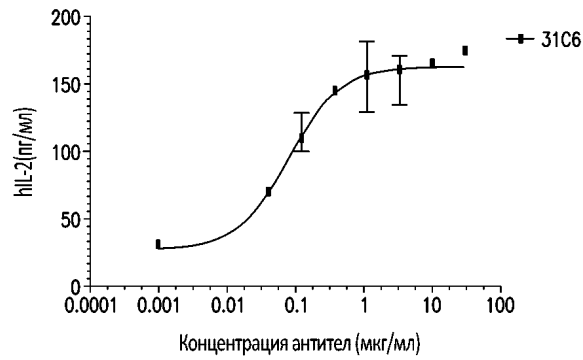
Фиг. 4

Титрование антител против TIGIT человека в функциональном анализе на основе клеток

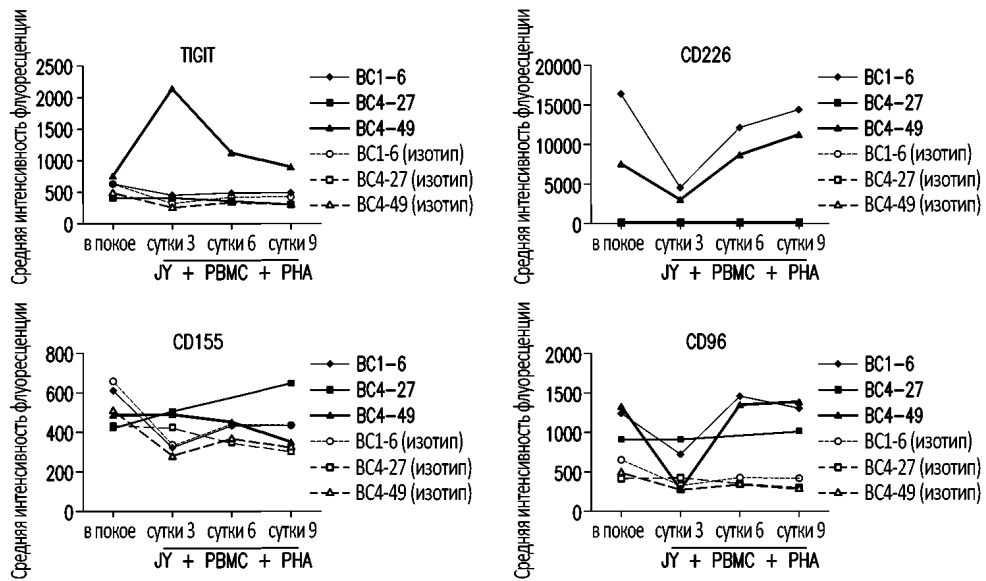


Фиг. 5

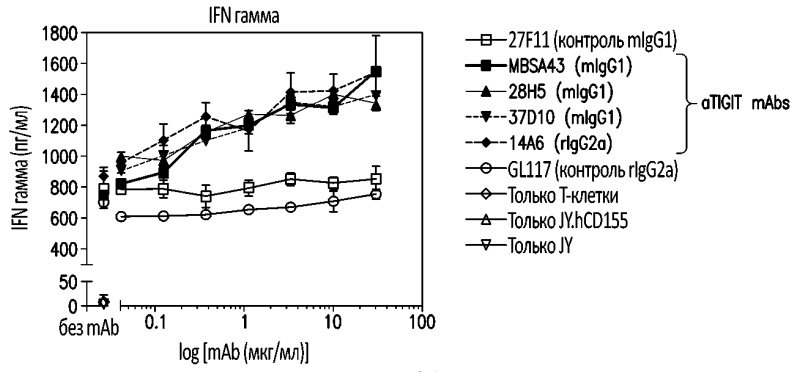
Титрование антител против TIGIT человека в функциональном анализе на основе клеток



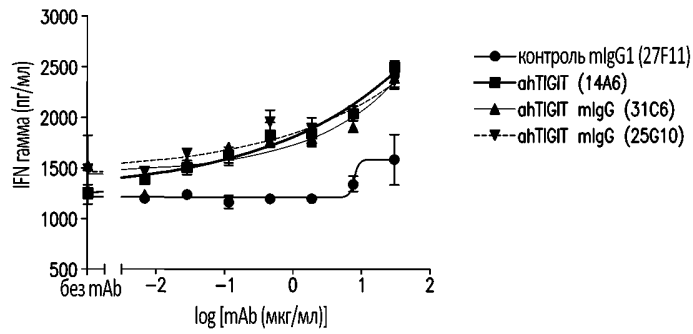
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8А



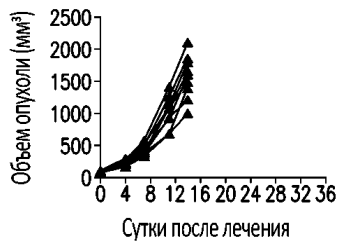
Фиг. 8В

Антитело против TIGIT (GIGD7)+антитело против PD-1



Фиг. 9А

Контроль изотипа

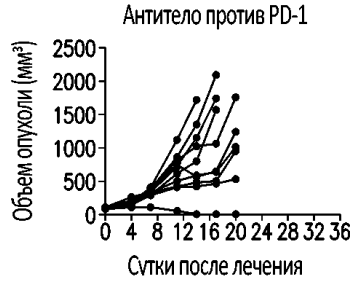


Фиг. 9В

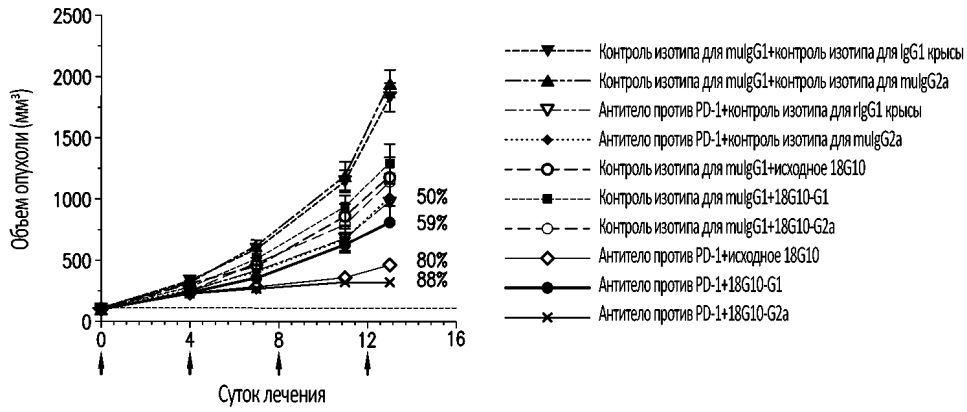
Антитело против TIGIT (GIGD7)



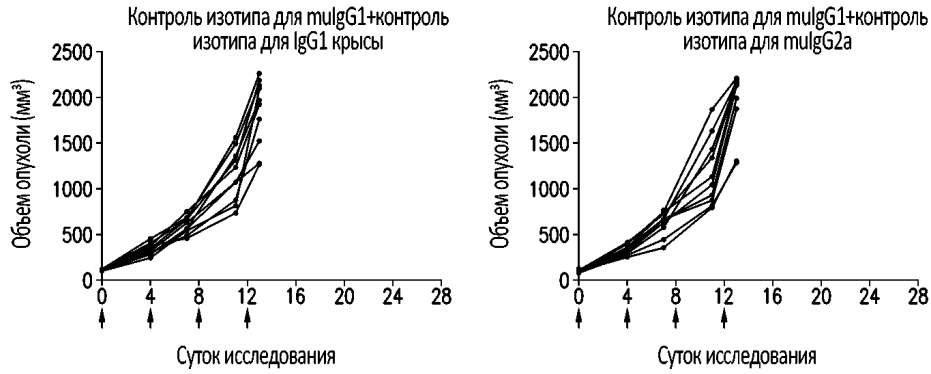
Фиг. 9С



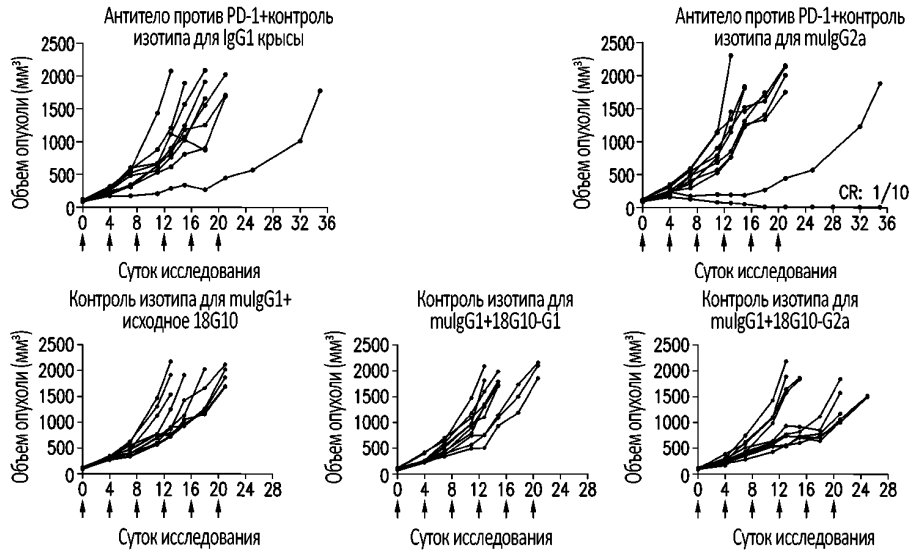
Фиг. 9D



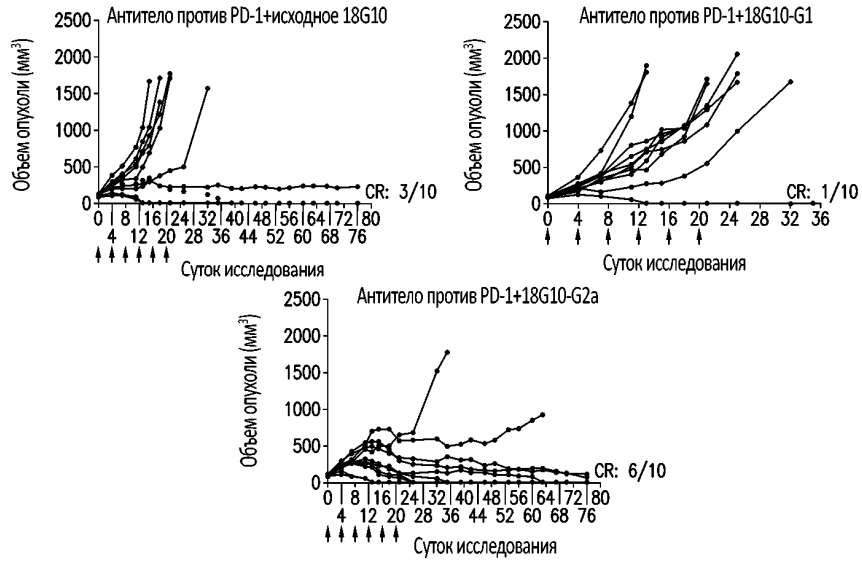
Фиг. 10



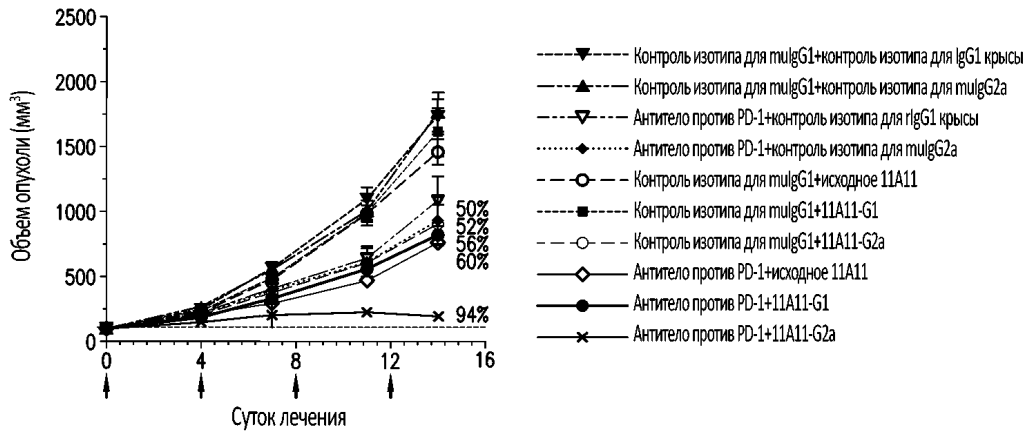
Фиг. 11А



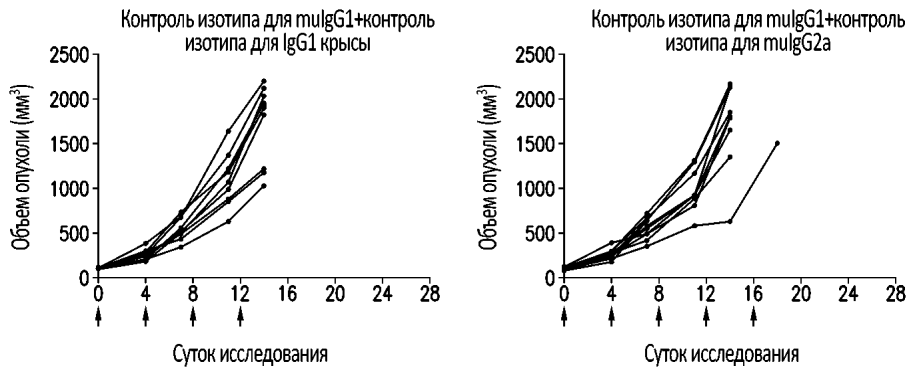
Фиг. 11В



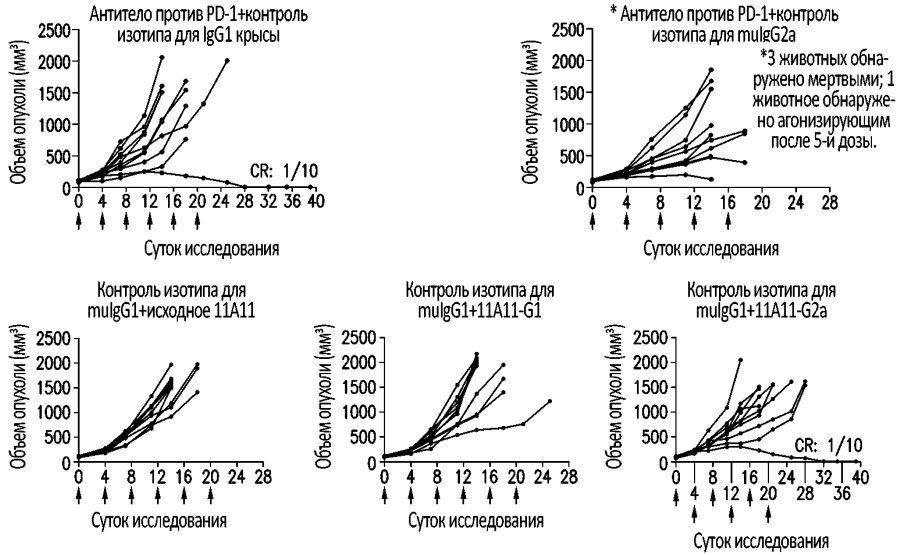
Фиг. 11С



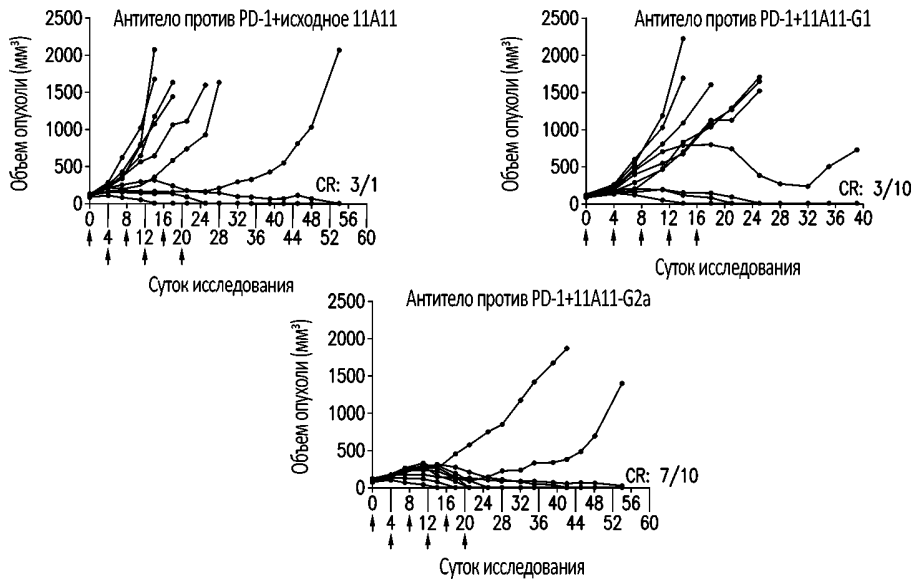
Фиг. 12



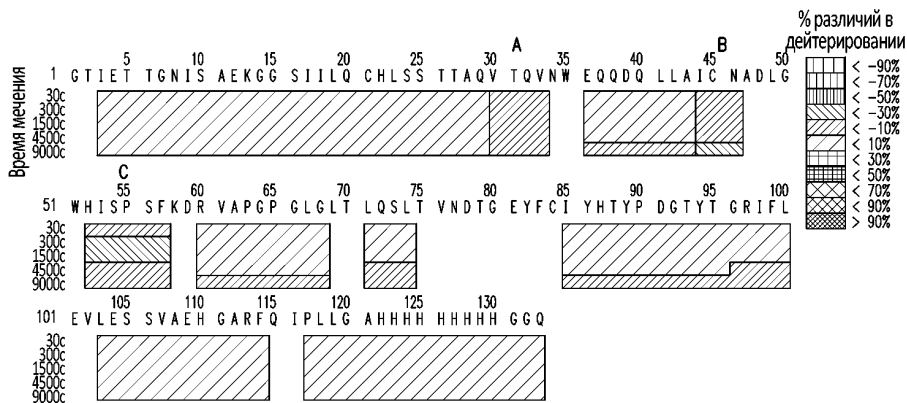
Фиг. 13А



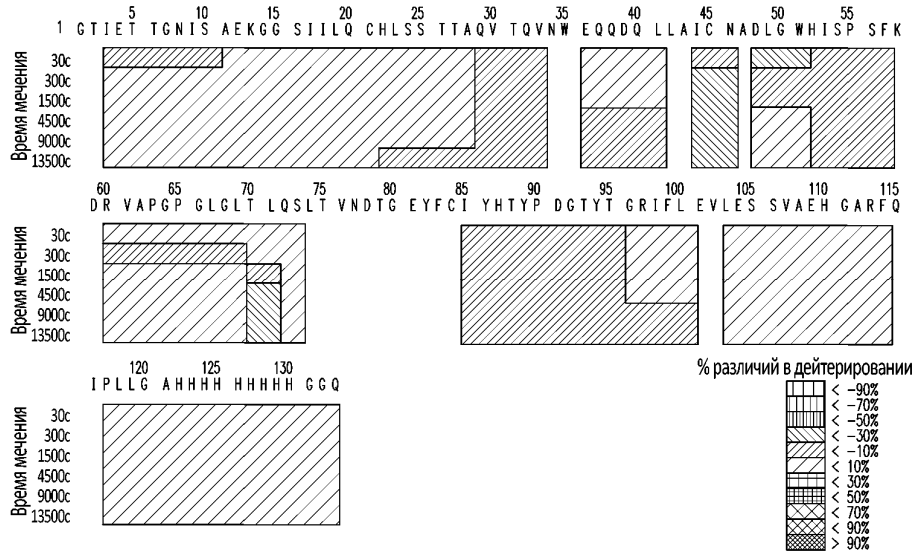
Фиг. 13В



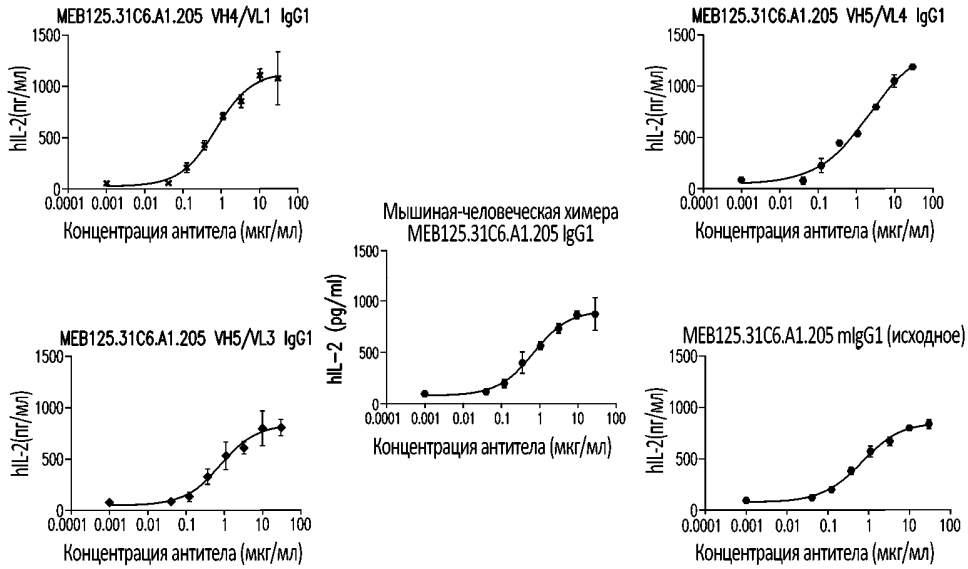
Фиг. 13С



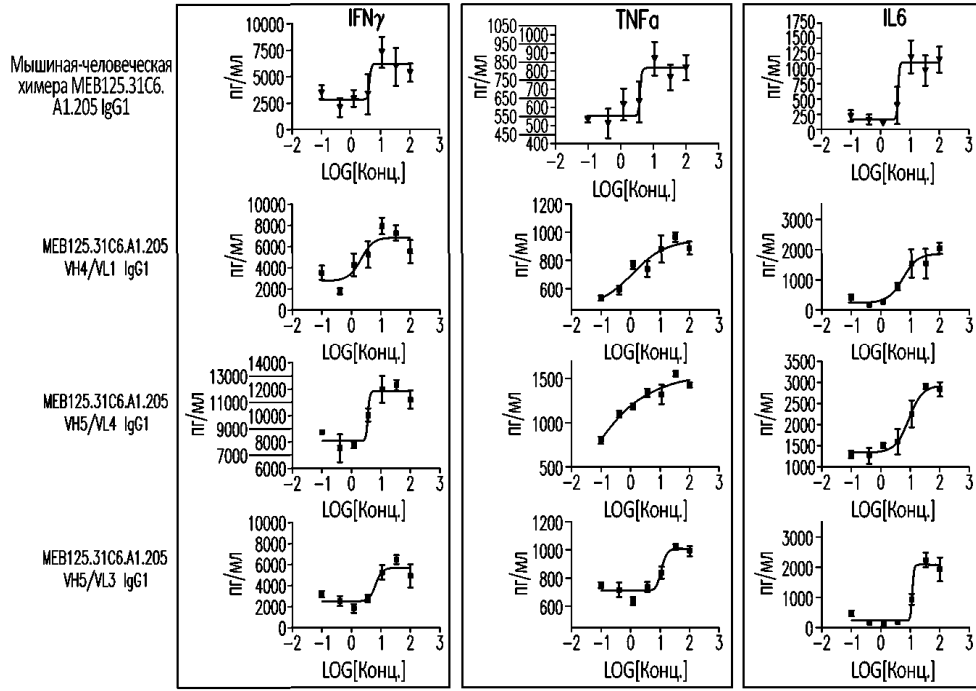
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

